

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Luciano Henrique Campestrini

**ESTRUTURA QUÍMICA, PROPRIEDADES REOLÓGICAS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE CARBOIDRATOS OBTIDOS DE *Aloe barbadensis* Miller**

Curitiba

2013

Luciano Henrique Campestrini

**ESTRUTURA QUÍMICA, PROPRIEDADES REOLÓGICAS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE CARBOIDRATOS OBTIDOS DE *Aloe barbadensis* Miller**

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia
Duarte Nosedá

Curitiba

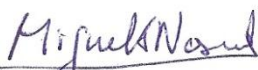
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIANO HENRIQUE CAMPESTRINI

Estrutura química, propriedades reológicas e atividades biológicas de carboidratos obtidos de *Aloe barbadensis* Miller.

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



Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá (orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Rozângela Curi Pedrosa
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC



Prof^a. Dr^a. Juliana Bello Baron-Maurer
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Michele Rigon Spierr
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – UFPR



Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Departamento de Química – UFPR

Curitiba, 29 de janeiro de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Miguel Daniel Nosedá, pela orientação e pela confiança depositada em mim e no trabalho desenvolvido.

À Professora Maria Eugênia Duarte Nosedá, por ter ensinado muito além da química de carboidratos.

À Professora Joana Lea Silveira, pela colaboração, pela paciência e disposição em partilhar comigo seu conhecimento da ciência da reologia, além de ter acompanhado o trabalho durante os quatro anos como banca interna. Muito obrigado!

Agradeço a Professora Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz, pelo acompanhamento do trabalho ao longo dos quatro anos e à Professora Juliana Bello Baron Maurer, pela participação na banca interna. Muito obrigado pelos conselhos!

À professora Cândida Aparecida Leite Kassuya, da Universidade Federal da Grande Dourados – MS, pela colaboração com os ensaios de inflamação e pela empolgação em querer fazer sempre mais.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências – Bioquímica pela oportunidade de poder lhe dar minha parcela de contribuição.

Aos demais professores do grupo de carboidrato: Thales R. Cipriani, Lucimara M. Cordeiro, Selma F. Z. Baggio, Marcelo Iacomini e Philip A. G. Gorin e Diogo B. Ducatti, pela paciência em dividir comigo suas experiências. Também aos demais professores do departamento que fazem um trabalho de qualidade e amor pela nossa formação.

Ao professor Guilherme Lanzi Sassaki, pela ajuda com os espectros de RMN.

Ao Professor Roberto Pontarolo pela grande gentileza de abrir seu laboratório, bem como ao Dr. Marco André que auxiliou nas análises. Muito obrigado.

Ao Sr^a Cacilda e Sr. Dionísio, proprietários da Empresa Naturama Sucos Integrais do Brasil, pelo fornecimento do material em estudo, sem o qual o trabalho não seria possível.

Meu especial carinho a importantes pessoas, de uma humanidade sem igual, que foram mais que profissionais, às quais me honra poder chamar de

amigas. Professoras Juliana Bello Baron Maurer, Selma Faria Sawadzki Baggio e Fabíola Stevan Hancke! Minha eterna gratidão por terem ligado muitas luzes no meu andar pela obscura e tortuosa estrada do doutorado.

Às sempre prestativas técnicas de laboratório, Elizângela e Rosane. A vocês meu agradecimento. Sem sua ajuda, trabalho nenhum poderia sair a contento.

À técnica Grazielle do Departamento de Química da UFPR, pela ajuda com as análises de FT-IR.

Aos funcionários do Biotério da UFPR pela disposição em ajudar sempre que precisávamos.

Ao professor José Vicente Teixeira Pinto, pela amizade e por ter me inserido na família UFPR.

À minha família. Minha mãe Helena, meu irmão Sérgio, minha cunhada Rosemeri e meu sobrinho Pietro. Mesmo cada vez mais distante, não esqueço vocês!

Ao Roberto Cirino pela sua amizade e ajuda com a parte gráfica do artigo e da tese. Quem tem um amigo assim, tem um tesouro!

A todos os colegas do laboratório 248 e E3 que passaram por lá durante minha estadia ou que ainda lá estão. Juliana Cassolato, Luciana, Juliana Ropelato, Taline, Louise, Tatiane (a mulher do nome gigante!), Tatiana, Juliana Teodoro, Ester, Jenifer, Mariana, Cassiano, Diego, Pauline e Richard Phillipy.

Um abraço especial à todos do laboratório do NUPPLAMED, Raquelly, minha parceira! Quando trabalho a gente teve, mas quanta alegria tive durante o período que convivemos! Fernanda Bovo, Fábio, Andressa, Yara, Iara, Melina, Gisele e Carol, a vocês, muito obrigado por partilhar sua companhia.

Às colegas do Departamento de Biotecnologia, Sacha e Marisa, pelo apoio e parceria que tive no início do doutorado.

Aos colegas dos laboratórios do grupo de carboidratos, que sempre estiveram dispostos a ensinar. Obrigado Fernanda Simas, Fhernanda Smiderle, Andrea, Lauro, Ana Helena, Arquimedes, Daniel, Yana, Dirce, Elaine Carbonero, Nessana, Camila (chuchu), Larry, Aramis, Elaine, Lúcia, Rogério e Marília.

Ao Dr. Lauro Mera de Souza pelas ajudas nas análises de ESI-MS e ao Prof. Dr. Marcelo Muller dos Santos pelo auxílio com as análises de MALDI-TOF.

Agradecimento especial à amiga Rhayla que me auxiliou e teve paciência em ensinar a domar o reômetro ajudando com os experimentos de reologia!

À colega Heide pelas discussões da parte de reologia do artigo. Suas idéias e sugestões foram muito importantes.

Não poderia faltar um agradecimento particular à amiga Mariana Maia Taulois do Rosário. Essa menina resistiu bravamente aos meus “quebra-costelas” Nana, grande beijo!

Aos colegas do grupo de oxidações biológicas. Sou grato pelas horas de alegria que compartilhamos.

Agradeço à secretária da Pós, Irene, pela ajuda com a burocracia.

Ao Sr. Herculano S. Reis Filho do Laboratório de Histotecnologia, pelos corantes utilizados nas colorações das culturas de macrófagos.

Aos meus amigos de Floripa: Shirley, Fernanda, Vanessa, Wagner. Mesmo estando longe não os esqueço e tenho certeza de que nunca perderemos nosso vínculo.

Também agradeço ao Grupo de Observadores de Aves de Curitiba, que me proporcionou conhecer a cidade e região de Curitiba de um jeito particular.

Ao CNPq, Pronex-Carboidratos e UGF – seti PR (CV 43-08), pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	(a) Classificação taxonômica de <i>A. barbadensis</i> ; (b) exemplar de <i>A. barbadensis</i> em estágio de floração; (c) corte transversal da folha de <i>A. barbadensis</i> , corada com verde malaquita e vermelho do Congo. ep – epiderme, mf – mesófilo, pr – parênquima de reserva, conjuntos de canais condutores do extrato do parênquima clorofiliano, indicados pela seta.....	5
FIGURA 2 –	Representação esquemática de uma glucomanana acetilada isolada das folhas de <i>Aloe barbadensis</i>	8
FIGURA 3 –	(a) Representação esquemática proposta para a acemanana, (b) representação esquemática da galactana e (c) representação esquemática da glucomanana isoladas do EA de <i>A. barbadensis</i>	11
FIGURA 4 –	Estrutura esquemática das maloilglucanas: veracilglucana A(1), B (2) e C (3), isoladas do EA	13
FIGURA 5 –	Modelo de fluxo entre duas placas paralelas, onde 1 – líquido cisalhado; 2 – placa em movimento com área de cisalhamento; 3 – placa estacionária.....	15
FIGURA 6 –	Comportamentos de fluxo, onde τ = tensão de cisalhamento, γ = taxa de cisalhamento.....	17
FIGURA 7 –	Teste de fluência e recuperação.....	22
FIGURA 8 –	Representação gráfica de sistemas polissacarídicos típicos: (a) gel forte; (b) solução concentrada; (c) solução diluída.....	25
FIGURA 9 –	Conversão do oxigênio molecular à água.....	30
FIGURA 10 –	Atividades biológicas do fator de necrose tumoral (TNF) nas diferentes células e tecidos	38
FIGURA 11 –	Processo de obtenção do EA e da FP	45
FIGURA 12 –	Fracionamento da Fração Polissacarídica (FP) por microfiltração e dialise	46
FIGURA 13 –	Ensaio de ELISA de captura	65
FIGURA 14 –	Perfis de eluição, do EA (a), FP (b) obtidos por HPSEC/MALLS/RI e glucose (c). — RI, - - - MALLS..	71
FIGURA 15 –	Espectro de RMN de ^{13}C , relativo à EA (a) e FP (b) obtidos a 70°C em D_2O , usando acetona como padrão interno (30,2 ppm)	72
FIGURA 16 –	Espectro de RMN de ^1H , relativo à FP obtido a 65°C em D_2O , usando acetona como padrão interno (2,22 ppm) .	73
FIGURA 17 –	Espectros de (a) COSY e (b) HSQC de FP, obtidos a 65 °C em D_2O	74
FIGURA 18 –	Espectro de DEPT 135, relativo à FP obtido a 70°C em D_2O , usando acetona como padrão interno (30,2 ppm)..	76
FIGURA 19 –	Perfis de eluição em HPSEC-MALLS-RID das frações D1000R (a) e D500D (b). — RI, - - - MALLS	79
FIGURA 20 –	Espectros de RMN de ^1H (a) e ^{13}C (b) da fração HP. Espectros obtidos a 65°C em D_2O , usando acetona como padrão interno (2,22 e 30,2 ppm).....	82

FIGURA 21 –	Espectro de HSQC da fração HP. Espectro obtido a 65°C em D ₂ O	83
FIGURA 22 –	Cinética da hidrólise enzimática de FP nativa sob ação da β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase (a) e cromatografia em coluna de Biogel P2 do hidrolisado solúvel da FP, pela enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase. Os número 1 e 2 representam respectivamente as regiões de exclusão e de inclusão dos oligossacarídeos (b)	85
FIGURA 23 –	Espectro de massas MALDI-TOF da sub-fração 2	87
FIGURA 24 –	Perfis de eluição em HPSEC-MALLS-RID da fração SP. — RI, - - - MALLS	88
FIGURA 25 –	Espectro de RMN de ¹ H (a) e RMN de ¹³ C (b) da fração SP. Os espectros foram adquiridos em D ₂ O a 65°C, usando acetona como padrão interno (2,22 e 30,2 ppm)	90
FIGURA 26 –	Espectro de HSQC da molécula SP, obtido a 65 °C em D ₂ O	92
FIGURA 27 –	Cinética da hidrólise enzimática de FP desacetilada sob ação da enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase (a) e cromatografia em camada delgada referente à hidrólise da FP desacetilada pela enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase. G = glucose, M = manose, os números de 0 a 12 representam o tempo em horas da reação (b)	93
FIGURA 28 –	Espectro de IR da FP (- - -) e do material resistente a hidrólise enzimática (—) pela β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase	95
FIGURA 29 –	Cromatografia em Biogel P2 do hidrolisado solúvel após tratamento com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase da fração FP (a) e CCD dos compostos isolados da FP desacetilada hidrolisada com a enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase, através da cromatografia em coluna (CC). Man, manose; Mal, maltose e HT, hidrolisado total (b)	96
FIGURA 30 –	Perfis de ESI-MS dos produtos purificados do tratamento com a glucanase da fração FP desacetilada. Em (a), dissacarídeo correspondente ao pico 2 da CC, em (b), trissacarídeo correspondente ao pico 1 da CC	97
FIGURA 31 –	Cinética da hidrólise enzimática de FP nativa sob ação da enzima β -endo-1,4-D-mananase (a) e Cromatografia em coluna de Biogel P2 do hidrolisado obtido da FP, pela enzima β -endo-1,4-D-mananase (b)	99
FIGURA 32 –	Perfil de eluição da molécula MNR2, obtida da hidrólise enzimática de FP pela enzima β -endo-1,4-D-mananase. — RI, - - - MALLS	100
FIGURA 33 –	Espectros de RMN de ¹ H (a) e RMN de ¹³ C (b) da fração MNR2 obtida a partir da hidrólise com mananase de FP nativa. Os espectros foram adquiridos em D ₂ O a 65°C, usando acetona como padrão interno (2,22 e 30,2 ppm)	102

FIGURA 34 –	Espectro de HSQC da molécula MNR2, obtido a 65 °C em D ₂ O	103
FIGURA 35 –	Cinética da hidrólise enzimática de FP desacetilada sob ação da enzima β -endo-1,4-D-mananase (a) e cromatografia em coluna de BioGel P2 do hidrolisado obtido da FP desacetilada, pela enzima β -endo-1,4-D-mananase (b)	106
FIGURA 36 –	Cromatografia em camada delgada dos compostos isolados da FP pela cromatografia em coluna (CC), hidrolisada com a enzima β -endo-1,4-D-mananase. Raf, rafinose; Mal, maltose; Man, manose. P1 a P5, picos da CC	107
FIGURA 37 –	ESI-MS dos compostos obtidos FP desacetilada, através da hidrólise com β -endo-1,4-D-mananase. Os espectros de massas estão assinalados de acordo com os picos obtidos na cromatografia em coluna	108
FIGURA 38 –	Curva de fluxo (a) e curva de viscosidade aparente (b) como função da taxa de cisalhamento para as amostras de EA ($\blacktriangle$ $\blacksquare$ $\bullet$) e FP ($\triangle$ $\square$ $\circ$) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 g L ⁻¹ . As análises foram realizadas a 25 °C utilizando um sensor pp35-Ti	111
FIGURA 39 –	Varredura de frequência a 25°C para as amostras de EA (a) e FP (b) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 g L ⁻¹ , com sensor pp35-Ti a 1 Pa de tensão	115
FIGURA 40 –	Ensaio de fluência e recuperação para as amostras de EA ($\blacktriangle$ $\blacksquare$ $\bullet$ - a) e FP ($\triangle$ $\square$ $\circ$ - b) a concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 g L ⁻¹ , mensurados a 3 Pa de tensão, a 25 °C, utilizando um sensor pp35-Ti	118
FIGURA 41 –	Atividade sequestradora do radical DPPH	120
FIGURA 42 –	Avaliação do poder redutor das amostras	121
FIGURA 43 –	Determinação da atividade de captação de radicais superóxido pelas amostras em comparação com a atividade dos padrões ácido gálico e ácido ascórbico ...	123
FIGURA 44 –	Determinação da atividade de captação de radicais hidroxila pelas amostras	124
FIGURA 45 –	Determinação da atividade de captação de radicais NO [•] pelas amostras	126
FIGURA 46 –	Determinação da atividade de quelação de Fe ²⁺ pelas amostras	127
FIGURA 47 –	Efeito das amostras na viabilidade celular, nas concentrações de 2,5; 10; 40; 160 e 640 μ g mL ⁻¹	131
FIGURA 48 –	Efeitos das amostras na produção de óxido nítrico por macrófagos aderentes incubados por 48 h, na ausência (controle) e presença das amostras	133
FIGURA 49 –	Efeitos das amostras na produção de citocinas TNF- α (a) e IL-6 (b) por macrófagos aderentes incubados por 24 h, na ausência (controle) e presença das amostras	136
FIGURA 50 –	Efeitos das amostras na produção de citocinas IL-10 (a) e IL-1 β (b) por macrófagos aderentes incubados por 24 h, na ausência (controle) e presença das amostras	138

FIGURA 51 –	Ação dos receptores de membrana e solúveis de IL-1 ...	141
FIGURA 52 –	Efeito do tratamento de 24 h com a fração FP e HP sobre a morfologia de macrófagos peritoneais de camundongos	143
FIGURA 53 –	Efeito do tratamento de 24 h com a fração MNR2 e SP sobre a morfologia de macrófagos peritoneais de camundongos.....	144
FIGURA 54 –	Efeito das frações FP e HP (a) e MNR2 e SP (b) na concentração de 20 $\mu\text{g pata}^{-1}$, no ensaio de edema induzido pela carragenina administrada intraplantar. Dexametasona 0,5 mg kg^{-1} intraplantar foi utilizada como controle positivo	146
FIGURA 55 –	Efeito anti-inflamatório das amostras administradas pela via sub-cutânea (10 mg kg^{-1}), no ensaio de edema induzido pela carragenina (Cg), após 120 min. Dexametasona 0,5 mg kg^{-1} intraplantar foi utilizada como controle positivo	147

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Glucomananas oriundas de vegetais superiores quanto à origem e suas características químicas.....	7
TABELA 2 –	Espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) de interesse biológico.....	29
TABELA 3 –	Composição química e composição monossacarídica das frações EA e FP, obtidas das folhas de <i>A. barbadensis</i>	68
TABELA 4 –	Análise química da fração HP obtida a partir de FP.....	80
TABELA 5 –	Identificação dos principais oligossacarídeos presentes no espectro da figura 23.....	87
TABELA 6 –	Assinalamento dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H da fração SP.....	91
TABELA 7 –	Análises químicas de MNR2, obtida através da hidrólise com mananase de FP nativa	100
TABELA 8 –	Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H da fração MNR2 obtida através da hidrólise enzimática de FP.....	104
TABELA 9 –	Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos da FP nativa e FP desacetilada	109
TABELA 10 –	Comparação para as diferentes concentrações das amostras EA e FP, obtida das folhas de <i>A. barbadensis</i> , no ensaio de comportamento de fluxo, de acordo com o modelo matemático de Ostwald-de-Waelle (Lei da Potência)	114
TABELA 11 –	Valores de inversão de G' e G'' para as amostras de EA e FP, obtidas de <i>Aloe barbadensis</i> Miller	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA	–	Butil-hidroxianisol
BHT	–	Butil-hidroxitolueno
CCD	–	Cromatografia em camada delgada
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
D ₂ O	–	Água deuterada
EA	–	Extrato Aquoso de <i>Aloe barbadensis</i> Miller
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	–	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FT-IR	–	Espectroscopia de infravermelho acoplada a transformada de Fourier
FP	–	Fração polissacarídica
GC-MS	–	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GLC-MS	–	Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas
HP	–	Polissacarídeo nativo de massa molar média
HPSEC	–	<i>High Pressure Size Exclusion Chromatography</i>
INF- γ	–	Interferon gama
IL	–	Interleucina
LPS	–	Lipopolissacarídeo bacteriano
MALLS	–	<i>Multi Angle Light Laser Scattering</i>
MEM	–	Meio mínimo essencial de Eagle
MNR2	–	FP nativa tratada com mananase e maior que 2 kDa
MTT	–	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NO	–	Óxido nítrico
PBS	–	<i>Phosphate Buffer Solution</i> - Solução salina tamponada
RI	–	Índice de refração
RMN- ¹³ C	–	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	–	Ressonância magnética nuclear de próton
SP	–	Polissacarídeo de baixa massa molar
TCA	–	Ácido tricloroacético
TFA	–	Ácido trifluoroacético
TNF- α	–	Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

A partir da polpa das folhas de *Aloe barbadensis* Miller foi obtido um extrato aquoso (EA) que após precipitação etanólica e dialise originou a fração polissacarídica FP, as quais foram caracterizadas quanto as suas propriedades químicas, reológicas e biológicas. FP apresentou uma relação molar de Man:Glc de 24:1 e 18,4% de grupos O-acetil. Análises químicas e espectroscópicas demonstraram que FP corresponde a uma β -D-glucomanana 4-ligada, 2,3-, 2-, 3-, e 6-O-acetilada. FP foi microfiltrada e dialisada obtendo-se a fração HP (53,2 kDa,) com uma razão molar Man:Glc de 19:1 e 17% de grupos O-acetil, e estruturalmente semelhante à FP. As frações FP nativa e desacetilada (NaOH 0,012M, 1h30min, 25°C) foram submetidas a hidrólise enzimática parcial com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase e β -endo-1,4-D-mananase. A fração FP nativa tratada com glucanase gerou uma fração de baixa massa molar denominada SP (MW 3,88 kDa), com uma relação Man:Glc de 49:1 e 18% de grupos O-acetil, além de um conjunto de oligossacarídeos acetilados constituídos por 4 a 9 unidades hexoses e 3 a 9 grupos O-acetil. A fração FP desacetilada tratada com glucanase originou apenas mono-, di- e trissacarídeos. FP nativa tratada com mananase gerou uma fração de elevada massa molar, denominada MNR2 (191,6 kDa) a qual apresentou uma relação Man:Glc de 18:1 e 10% de grupos O-acetil. FP desacetilada tratada com mananase gerou apenas mono-, di-, tri- e tetrassacarídeos. As frações EA, FP, HP, SP e MNR2 foram avaliadas em diferentes atividades biológicas/farmacológicas. Análises reológicas mostraram que as amostras EA e FP possuem comportamento de fluxo de líquidos não-Newtoniano e pseudoplástico. O modelo Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) forneceu os melhores ajustes aos resultados encontrados ($K > 1$ e $n < 1$). Análises oscilatórias mostraram que as amostras EA e FP possuem caráter viscoelástico e os ensaios de fluência e recuperação revelaram uma característica de um fluido viscoelástico com recuperação de deformação atingindo valores de compliança (J) constantes e diferentes de zero. As amostras EA, FP, HP, SP e MNR2 foram avaliadas quanto a atividade antioxidante. As atividades mais expressivas foram a captação do radical DPPH, poder redutor, captação de radicais $\text{HO}^\bullet$ e radicais $\text{NO}^\bullet$. Não foi observada nenhuma correlação entre atividade antioxidante e massa molar das frações testadas. As amostras FP, HP, SP e MNR2, foram testadas para avaliar seu efeito sobre macrófagos peritoneais de camundongos. A produção de $\text{NO}^\bullet$ foi estimulada em diferentes intensidades, pelas amostras FP, HP e SP (48 h). Diferentes repostas quanto à produção de citocinas (IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α) foram observadas. A produção de TNF- α foi aumentada pelas amostras FP e SP. IL-6 apresentou aumento de concentração devido a presença das amostras FP e HP, e um leve aumento foi estimulado por SP. Todas as amostras inibiram a produção de IL-1 β . Para IL-10 somente MNR2 estimulou sua produção. No ensaio de atividade anti-inflamatória utilizando o modelo de edema de pata, FP e SP administradas por via intraplantar foram tão efetivas quanto dexametasona na diminuição do edema. Em ensaio por via subcutânea todas as amostras mostraram efeito anti-inflamatório sistêmico significativo equivalente ao apresentado pela dexametasona.

Palavras chaves: *Aloe barbadensis*, glucomanana parcialmente acetilada, reologia, atividade antioxidante, ativação de macrófagos, atividade imunoestimulante, atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

An aqueous (AE) was obtained from the leaves pulp of *Aloe barbadensis* Miller which after ethanol precipitation and dialysis gave rise to the polysaccharidic fraction (PF). AE and FP were characterized for their chemical, rheological and biological properties. PF (1230 kDa) showed a Man:Glc molar ratio of 24:1 and 18,4% of acetyl groups. Chemical and spectroscopic analyses of PF indicate that this fraction is constituted by 4-linked glucomannann 2,3-, 2-, 3- and 6-O-acetylated. PF was microfiltrated and dialyzed giving rise to fraction HP (53.2 kDa) with a Man:Glc molar ratio of 19:1 and 17% of acetyl groups and structurally similar do PF. Native PF and deacetylated PF (NaOH 0.012 M, 1h30min, 25°C) were submitted to partial enzymatic hydrolysis with β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase e β -endo-1,4-D-mannanase. Native PF treated with glucanase originated a low molecular mass fraction named SP (3.88 kDa) with a Man:Glc molar ratio of 49:1 and 18% of acetyl together with a set of acetylated oligosaccharides with 4 to 9 hexose units and 3 to 9 acetyl groups. Glucanase treatment of deacetylated PF originated only mono-, di-, and trisaccharides. Native PF treated with mannanase gave rise to high molecular mass fraction named MNR2 (191.6 kDa), with a Man:Glc ratio of 18:1 and 10% of the acetylation. Deacetylated PF treated with mannanase produced only mono-, di-, tri- and tetrasaccharides. AE, PF, HP, SP and MNR2 fractions were evaluated for different biological/pharmacological activities. Rheological analyses showed that AE and PF solutions have a non-Newtonian and pseudoplastic flow behavior. The Ostwald-de-Waele model (power law) provided the best fit to the results ($K > 1$ and $n < 1$). Oscillatory analyses showed that AE and PF fractions have viscoelastic character and the creep and recovery tests showed a viscoelastic fluid characteristic with recovery of deformation reaching constant compliance (J) values other than zero. AE, PF, HP, SP and MNR2 samples were evaluated for antioxidant activity. The most expressive activities were capturing DPPH, reducing power, attracting radical $\text{HO}^\bullet$ and $\text{NO}^\bullet$ radicals. Lack of correlation between antioxidant activity and molecular mass of the samples was observed. PF, HP, SP and MNR2 samples were tested to evaluate their effect over mouse peritoneal macrophages. $\text{NO}^\bullet$ production was stimulated in different intensities, by PF, HP and SP samples (48h). Different responses for cytokines production (IL-10, IL-1 β , IL-6 and TNF- α) were observed. TNF- α production was increased by PF and SP samples. IL-6 concentration increased due to the presence of PF and HP, and a light increase was stimulated by SP. All the samples inhibited the production of IL-1 β . For IL-10 only MNR2 stimulated its production. In the anti-inflammatory assay using the paw edema test, PF and SP were effective in reducing edema such as the dexamethasone control. In the subcutaneous test all samples showed significant systemic anti-inflammatory effect equivalent to that of dexamethasone.

Keywords: *Aloe barbadensis*, partially acetylated glucomannan, rheology activity, antioxidant activity, macrophages activation, immunostimulant activity, anti-inflammatory activity

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas e siglas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivo	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Revisão da literatura	4
3.1. Espécie vegetal em estudo: <i>Aloe barbadensis</i> Miller	4
3.2. Mananas e glucomananas	6
3.2.1. Estratégia metodológica para a caracterização estrutural de glucomananas: obtenção de produtos por hidrólise enzimática ..	8
3.3. Polissacarídeos do parênquima de reserva de <i>Aloe barbadensis</i>	9
3.4. Aplicações industriais e propriedades farmacológicas	13
3.5. Reologia	14
3.5.1. Reologia de polímeros	15
3.5.2. Fluidos newtonianos	16
3.5.3. Fluidos não newtonianos	17
3.5.4. Modelos reológicos	19
3.5.4.1. Modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da potência)	19
3.5.4.2. Modelo de Herschel-Bulkley	20
3.5.4.3. Modelo de Casson	20
3.5.5. Funções viscoelásticas lineares	21
3.5.5.1. Ensaio de fluência e recuperação	21
3.5.6. Testes dinâmicos	23
3.5.7. Reologia de polissacarídeos	26
3.6. Aspectos relacionados às propriedades antioxidantes	27
3.6.1. Estresse oxidativo e radicais livres	27
3.6.2. Defesas antioxidantes	31
3.6.2.1. Defesas enzimáticas	32
3.6.2.2. Defesas não-enzimáticas	33
3.7. Aspectos relacionados às propriedades como agentes imunomoduladores	35
3.7.1. Macrófagos	35
3.7.2. Produtos do metabolismo de macrófagos: óxido nítrico	36
3.7.3. Citocinas	37
3.8. Aspectos relacionados ao processo inflamatório	40
3.8.1. Mediadores do processo inflamatório	41

4. Material e métodos	44
4.1. Obtenção e processamento da matéria-prima vegetal	44
4.2. Processo extrativo dos polissacarídeos	44
4.3. Fracionamento dos polissacarídeos por diálise e microfiltração	46
4.4. Métodos analíticos gerais	47
4.5. Hidrólise	47
4.6. Análise de metilação.....	48
4.7. Cromatografia líquido-gasosa (CLG) e cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas (CLG-EM).....	48
4.8. Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência acoplada a detector de espalhamento de luz multiângulos e índice de refração (HPSEC/MALLS/RI) – Análise de homogeneidade e massa molar	49
4.9. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	51
4.9.1. Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono 13 (RMN - ^{13}C) e de próton (RMN – ^1H) unidimensionais (1D)	51
4.9.2. Experimentos de RMN bidimensionais (2D)	51
4.10. Estratégia metodológica para a desacetilação da fração polissacarídica (FP)	52
4.11. Estratégia metodológica para a despolimerização de FP	52
4.11.1. Despolimerização enzimática da FP nativa	52
4.11.2. Despolimerização enzimática da FP desacetilada	53
4.12. Cromatografia em camada delgada (CCD)	53
4.13. Cromatografia de gel permeação em Biogel P2	53
4.14. Análise em ESI-MS (<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>)..	54
4.15. Análise em MALDI-TOF (<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry</i>).....	54
4.16. Análises reológicas	55
4.17. Ensaio <i>in vitro</i> para determinação da atividade antioxidante	56
4.17.1. Ensaio pela determinação da atividade sequestradora do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (DPPH)	56
4.17.2. Ensaio da determinação do poder redutor	57
4.17.3. Ensaio da determinação da capacidade seqüestradora do anion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$)	57
4.17.4. Atividade de captação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$)	58
4.17.5. Atividade de captação do radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$).....	58
4.17.6. Atividade de quelação de Fe^{2+}	59
4.18. Ensaio de imunoestimulação de macrófagos peritoneais de camundongo	60
4.18.1. Procedimentos gerais	60
4.18.2. Preparação das soluções-teste utilizados nos experimentos com cultura de macrófagos	60
4.18.3. Obtenção de macrófagos	61
4.18.4. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT	62
4.18.5. Dosagem de óxido nítrico produzido por cultura de macrófagos peritoneais	63

4.18.6. Dosagem de citocinas por cultura de macrófagos peritoneais ..	64
4.18.7. Análises morfológicas	66
4.19. Ensaio de edema de pata em camundongo	66
4.19.1. Animais utilizados no ensaio de edema de pata	66
4.19.2. Teste do edema induzido pela carragenina	66
4.20. Análise estatística	67
5. Resultados e discussão	68
5.1. Obtenção, rendimentos e análises químicas do Extrato Aquoso de Aloe (EA) e da Fração Polissacarídica (FP)	68
5.2. Análises de homogeneidade e massa molar por HPSEC/MALLS/RI	70
5.3. Análises por RMN das amostras EA e FP	72
5.4. Fracionamento da fração polissacarídica	78
5.5. Obtenção de produtos por hidrólise enzimática	83
5.5.1. Tratamento da FP nativa com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase	84
5.5.2. FP desacetilada tratada com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase	92
5.5.3. FP nativa tratada com β -endo-1,4-D-mananase	98
5.5.4. Hidrólise enzimática parcial de FP desacetilada com β -endo-1,4-D-mananase	105
5.6. Análise reológica	110
5.6.1. Análise do comportamento de fluxo de EA e FP	110
5.6.2. Comportamento viscoelástico de EA e FP	114
5.6.3. Ensaio de fluência e recuperação	117
5.7. Efeito das amostras nas atividades antioxidantes	119
5.7.1. Efeito das amostras na captação do radical DPPH	119
5.7.2. Efeito das amostras sobre a atividade de poder redutor	120
5.7.3. Atividade de inativação do ânion superóxido	122
5.7.4. Efeito das amostras na captação de radicais hidroxila	123
5.7.5. Captação de radicais óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$).....	125
5.7.6. Atividade sobre a quelação de Fe^{2+}	127
5.8. Ensaio de imunomodulação	130
5.8.1. Efeito das frações na viabilidade celular de macrófagos	130
5.8.2. Determinação da produção de óxido nítrico	132
5.8.3. Dosagem de citocinas	135
5.8.4. Morfologia dos macrófagos	142
5.9. Ensaios de edema de pata	145
6. Conclusões	151
7. Perspectivas	153
8. Referências	154

1. INTRODUÇÃO

As aloes são popularmente conhecidas por babosa. *Aloe barbadensis* Miller é uma das espécies que apresenta maior interesse terapêutico e nutricional, devido as suas propriedades medicinais (ARAÚJO et al., 1999). As aloes são utilizadas na medicina popular, devido aos seus efeitos benéficos principalmente para o tratamento de problemas de pele e no controle de infecções e inflamações (VISUTHIKOSOL et al., 1995; OKAMURA et al., 1996; VÁZQUEZ et al., 1996; AVILA et al. 1997; RODRIGUEZ et al., 2005). O extrato aquoso (EA) obtido de suas folhas é o principal produto utilizado, e é constituído, majoritariamente, de polissacarídeos, além de outros compostos (YUSUF, AGUNU, DIANA, 2004).

Estudos demonstram que polissacarídeos exibem um grande número de propriedades terapêuticas, incluindo a modulação do sistema imune inato, mais especificamente da função de macrófagos, além de outras atividades como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária (SHEETS, et al., 1991; VAZQUEZ et al., 1996; STUART et al., 1997; YUN et al., 1997; HRCKOVA, VELEBNY 2001; SCHEPETKIN, QUINN, 2006). Para *A. barbadensis*, tanto o extrato aquoso (EA), como a fração polissacarídica obtida por precipitação etanólica (denominada FP), apresentam atividade cicatrizante, antiangiogênica, antiulcerativa, antineoplásica e antiviral (KIM, KACEW, LEE, 1999; PAEZ et al., 2000; CAMPESTRINI, 2007). Nos estudos utilizando o EA, sugere-se que as atividades biológicas possam ser atribuídas pela interação sinérgica de seus constituintes (FEMENIA et al., 1999).

O EA é utilizado comercialmente, em formulações farmacêuticas, cosméticas e nutracêuticas, sendo que muitos dos benefícios atribuídos a ele devem-se à presença de polissacarídeos (NI et al., 2004). O uso comercial de muitos polissacarídeos está baseado na sua capacidade de alterar as propriedades físicas das soluções, como o ponto de geleificação e a viscosidade. Existe um crescente interesse comercial relacionado ao uso das aloes nos diferentes setores industriais. Muitos de seus produtos disponíveis no mercado são constituídos de componentes não purificados ou parcialmente purificados presentes no EA. Desta forma, há uma carência de estudos com

frações isoladas e caracterizadas quimicamente em relação às suas propriedades reológicas.

Dos inúmeros trabalhos descritos para a principal fração polissacarídica (FP) de *A. barbadensis*, a informação mais relevante acerca de sua estrutura é que esta fração é constituída de manose e glucose com substituintes acetil e ramificações de galactose nas unidades de manose. Esta estrutura proposta é denominada de acemanana (TURNER et al., 2004). Entretanto, alguns aspectos em relação às características químicas de FP ainda podem ser explorados, como a presença ou não de mais de um tipo de polissacarídeo e suas variações de massa molar, o posicionamento dos grupamentos acetil e a presença de ramificações. No presente trabalho foram avaliadas a estrutura fina da fração polissacarídica e comparado com o comportamento reológico do extrato aquoso e da FP. Além disso, foram obtidos oligossacarídeos por técnicas de fracionamento e de tratamento enzimático. Estas frações foram caracterizadas por técnicas de ressonância magnética nuclear e de espectrometria de massas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi: obter e caracterizar quimicamente os polissacarídeos provenientes das folhas de *Aloe barbadensis* Miller, assim como avaliar suas propriedades reológicas, antioxidantes e imunomoduladoras.

2.2. Objetivos específicos

- ♣ Obter o extrato aquoso (EA) e frações polissacarídicas a partir de folhas de *A. barbadensis* Miller;
- ♣ Obter e purificar, utilizando técnicas cromatográficas, os oligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática da fração polissacarídica (FP) nativa e desacetilada;
- ♣ Caracterizar a estrutura química das frações polissacarídicas e dos oligossacarídeos, utilizando métodos químicos, espectroscópicos e espectrométricos;
- ♣ Determinar as propriedades reológicas do EA e da FP proveniente da polpa de *A. barbadensis*;
- ♣ Investigar as propriedades antioxidantes, imunomoduladoras e anti-inflamatória das frações de *A. barbadensis* previamente caracterizadas, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*;
- ♣ Relacionar as características estruturais das frações estudadas com as atividades biológicas obtidas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Espécie vegetal em estudo: *Aloe barbadensis* Miller

A *Aloe barbadensis* Miller pertencente à família Xanthorrhoeaceae (Figura 1a) é popularmente conhecida por babosa (MISSOURI BOTANICAL GARDEN). No Brasil ainda denomina-se por babosa-medicinal, erva-babosa, erva-de-azebre, caraguatá e caraguatá-de-jardim (SILVA JÚNIOR, 2003). Em outros países ela é conhecida como aloe, aloe de Barbados (Espanha), aloés de Curaçao (Inglaterra e Alemanha) e aloés (França) (WICHTL, 2004).

Esta espécie também apresenta as seguintes sinonímias científicas anteriormente utilizadas: *Aloe vera* (L.) Burm f. (WICHTL, 2004), *Aloe chinensis* Bak., *Aloe elongata* Murray, *Aloe indica* Royle, *Aloe officinalis* Forsk, *Aloe perfoliata* L., *Aloe rubescens* DC, *Aloe vera* L. var *littoralis* Köning ex Bark, *Aloe vera* L. var. *chinensis* Berger, *Aloe vulgaris* Lam. (WHO, 1999), *Aloe humilis* Blanco, *Aloe vera* L. var. *officinalis* Baker (SILVA JÚNIOR, 2003).

A espécie é nativa do sudeste e leste da África e foi introduzida no norte da África, península arábica, China, países mediterrâneos e Américas (WICHTL, 2004). Está amplamente adaptada no Brasil, ocorrendo em todas as regiões (SILVA JÚNIOR, 2003), e geralmente, cresce em áreas semidesérticas e em locais pedregosos e semi-áridos.

Do ponto de vista morfológico (Figura 1b), suas flores são tubulosas, de cor amarelada, pendentes, com pedicelos menores que as brácteas, dispostas em racemos terminais densos, de 30 a 40 cm de comprimento, sobre uma haste simples ou ramificada. As folhas são dispostas em roseta, reunindo até 20 unidades, com 50 a 60 cm de comprimento, 6 a 9 cm de largura e 3 cm de espessura na base; densas, lanceoladas, côncavas em sua face superior e convexa na face inferior; glauco-esverdeadas uniformes, sinuoso-serradas, carnosas, com pintas ou manchas brancas quando jovens, marginadas por espinhos triangulares, amarelos, curtos e espaçados. O corte transversal das folhas revela, externamente, uma camada de células epidérmicas de consistência elástica e impermeável que reveste uma segunda camada, o mesófilo, o qual contém canais condutores de extrato do parênquima clorofiliano (Figura 1c). Mais internamente, encontra-se o parênquima tissular

(parênquima de reserva), de aspecto vítreo, que se relaciona à condição xerófita da babosa, conservando a umidade do tecido por longo período de tempo. O extrato do parênquima clorofiliano é um líquido de consistência leitosa, coloração amarelo-ocre, sabor amargo e aroma rançoso, sendo produzido por células excretoras do mesófilo.

Reino: Plantae
 Divisão: Magnoliophyta
 Classe: Liliopsida
 Ordem: Asparagale
 Família: Xanthorrhoeaceae
 Gênero: Aloe
 Espécie: *Aloe barbadensis* Miller

APG III
 Missouri Botanical Garden

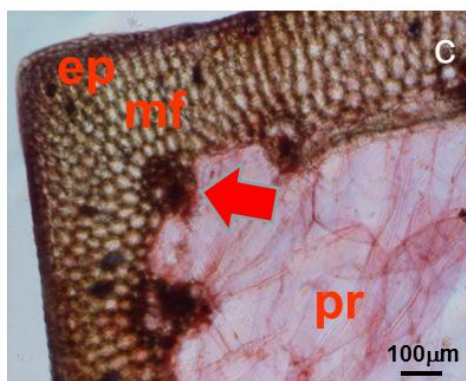


Figura 1 – (a) Classificação taxonômica de *A. barbadensis*; (b) exemplar de *A. barbadensis* em estágio de floração; (c) corte transversal da folha de *A. barbadensis*, corada com verde malaquita e vermelho do Congo. ep – epiderme, mf – mesófilo, pr – parênquima de reserva, conjuntos de canais condutores do extrato do parênquima clorofiliano, indicados pela seta.

Fonte: O autor.

3.2. Mananas e glucomananas

Dos polissacarídeos encontrados no parênquima tissular de *A. barbadensis*, destacam-se as glucomananas, que são polímeros formados por D-manose e D-glucose. Polímeros de D-manose (mananas) quer isoladamente ou em combinação com outras unidades monossacarídicas são um constituinte comum de polissacarídeos de plantas (ASPINALL, 1970).

As mananas e glucomananas de vegetais superiores apresentam o mesmo tipo de ligação glicosídica [β -(1 $\rightarrow$ 4)] e são constituídos principalmente de cadeias lineares. As glucomananas apresentam proporção relativa das unidades de Man e Glc que variam de 1:1 a 15:1, dependendo da fonte vegetal (Tabela 1).

Estes polissacarídeos são abundantes em vegetais, ocorrendo como produtos de reserva em tubérculos de konjac (*Amorphophallus konjac*), sementes de espécies do gênero *Iris*, bulbos de certas orquídeas do gênero *Dendrobium* e lírios (gênero *Lillium*) (HSIEH et al., 2008; ISHURD et al., 2001; HUA et al., 2004; KATSURAYA et al., 2003). São frequentemente associadas a xilanas e celulose como constituintes da parede celular de madeira (LUNDQVIST et al., 2002; SILVA et al., 2011; DEA, MORRISON, 1975; MILLANE, HENDRIXSON, 1994; TAKIGAMI, 2000; WILLFÖR et al., 2003; PETKOWICZ, SHAEFER, REICHER, 2007; da SILVA et al., 2011).

As glucomananas (Figura 2) são geralmente hidrofílicas, porém sua solubilidade em água pode ser reduzida devido à formação de múltiplas ligações de hidrogênio após o processo de purificação ou de secagem (KISHIDA, OKIMASU, KAMATA, 1978; GUANG et al., 1998). Entre outros parâmetros que afetam a solubilidade, a presença de substituintes como grupos acetil parece ser o mais importante devido ao fato de inibem a formação de ligações hidrogênio intramolecular, propiciando a solubilidade da glucomanana (GAO, NISHINARI, 2004).

Tabela 1 – Glucomananas oriundas de vegetais superiores quanto à origem e suas características químicas.

Espécie (*)	Parte do vegetal	Ligação	Razão Man:Glc	Referência
<i>Accer saccharum</i>	Seiva	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	2,3:1	Adams, 1961
<i>Aloe arborescens</i>	Folha	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	3,5:1	Wonsiewski, Blaschek, Franz, 1990
<i>Aloe barbadensis</i> Miller	Folha	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	22:1	Gaurhari, Das, 1980b
<i>Aloe plicatilis</i>	Folha	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	2,8:1	Pulsen, Fagerheim, Øverbye, 1978
<i>Aloe vera</i> ^a	Folha	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	31:1	Talmadge et al., 2004
<i>Amorphophallus konjac</i>	Tubérculo	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	2:1	Katsuraya et al., 2003
<i>Betula SP.</i>	Caule	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	2,1- 2,4:1	Teleman et al., 2003
<i>Bryonia lacinosa</i>	Sementes	β -D-(1 $\rightarrow$ 4) e α -D-(1 $\rightarrow$ 6)	1,01:1	Singh, Malviya, 2006
<i>Dendrobium huoshanense</i>	Caule	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	10:1	Hsieh et al., 2008
<i>Dendrobium officinale</i>	Caule	β -D-(1 $\rightarrow$ 4) e β -D-(1 $\rightarrow$ 6)	6:1	Hua et al., 2004
<i>Eremus iae</i>	Raízes	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	2,4:1	Smirnova, Mestechkina, Shcherbukhin, 2001
<i>Eremus zangezuristicus</i>	Raízes	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	3,3:1	Smirnova, Mestechkina, Shcherbukhin, 2001
<i>Larix laricina</i>	Caule	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	3-4:1	Kooiman, Adams, 1961
<i>Linum usitatissimum</i>	Fibras	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	1,5:1	Jacobs et al., 2003
<i>Lupinus varius</i>	Sementes	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	13,4:1	Ishurd et al., 2001
<i>Phoenix Dactylifera</i>	Sementes	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	13,3:1	Ishurd et al., 2001
<i>Populus tremulata</i>	Caule	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	1,8-2:1	Teleman et al., 2003
<i>Salvia officinalis</i>	Folha	β -D-(1 $\rightarrow$ 4)	1,3:1	Capek, 2009

(*) Nomenclatura científica

^a Atualmente denominada de *A. barbadensis*

Fonte: O autor

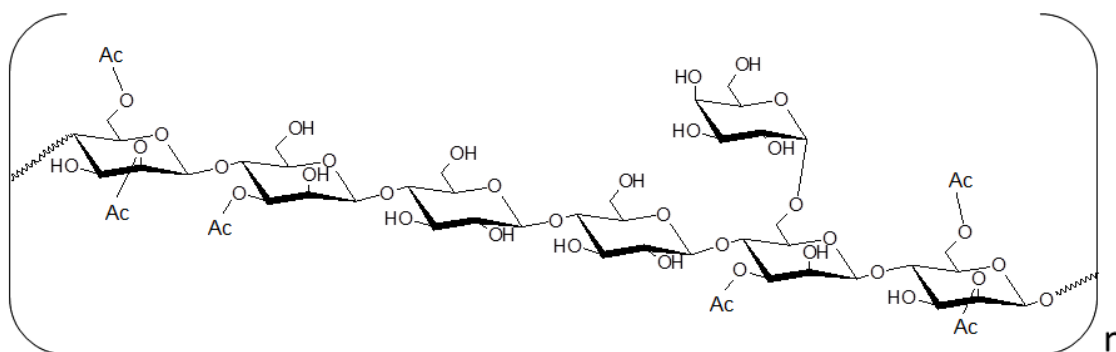


Figura 2 – Representação esquemática de uma glucomanana acetilada isolada das folhas de *Aloe barbadensis*.

Fonte: Talmadge et al., 2004; Turner et al., 2004.

Por razões termodinâmicas, uma β -D-(1 $\rightarrow$ 4) glucomanana, em solução, deve adotar uma conformação tipo “fita estendida”, onde os carbonos primários (C-6) projetam-se alternadamente para ambos os lados da cadeia linear. Esses polissacarídeos são caracterizados pela eficiência de suas ligações hidrogênio e pela perda de solubilidade (NIEDUSZYNSKI, MARCHESSAULT, 1972).

3.2.1. Estratégia metodológica para a caracterização estrutural de glucomananas: obtenção de produtos por hidrólise enzimática

As glicosidases mais utilizadas para a despolimerização de glucomananas são as β -mananases, β -manosidases e β -glucosidases (SUGIYAMA et al., 1973; SHIMAHARA et al., 1975; De VRIES, VISSER, 2001). Estudos mostram que a presença de grupos acetil substituintes inibem a ação das β -mananases e β -manosidases (GUEBITZ, HAYN, STEINER, 1996; TENKANEN, 1998). As endo- β -mananases apresentam especial interesse na clivagem do polissacarídeo pelo fato de atuar especificamente nas ligações β -D-1,4-manopiranosil, gerando oligossacarídeos do tipo manobiose e manotriose. A capacidade da β -mananase em degradar as glucomananas depende de vários fatores como o número e distribuição dos substituintes na cadeia principal e a razão Man:Glc (ERIKSSON, WINELL, 1968; YAMAZAKI,

SINNER, DRIETRICH, 1976; McCLEARY, MATHESSEN, 1983; CIVAS et al., 1984).

As enzimas endo- β -manosidases catalizam a quebra das ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) das unidades de D-manose em mano-oligossacarídeos e resulta na conversão de glucomananas em D-manose. Tal como as mananases, esta enzima está presente em muitos micro-organismos, plantas e tecidos animais (REESE, SHIBATA, 1965; DEY, 1978; ADEMARK et al., 1999). Finalmente, a hidrólise pela β -glucosidase (exo-glucosidase) ocorre somente na unidade de glucose do terminal não redutor, sendo interrompido quando a enzima atinge uma unidade de manose (OHYA et al., 1994).

Dentre esses produtos, estão os oligossacarídeos, que são compostos que, por hidrólise completa, resultam em um ou mais monossacarídeos, em números relativamente pequenos. Os mais frequentemente encontrados são os dissacarídeos e trissacarídeos. Os menos comuns são os tetrassacarídeos, pentassacarídeos e hexassacarídeos. No entanto, compostos com até 10 unidades monossacarídicas também estão incluídos no grupo de oligossacarídeos (STANĚK, ČERNÝ, PACÁK, 1965).

No presente trabalho, foram utilizadas as enzimas β -endo-1,4-D-mananase e β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase (β -glucosidase) para despolimerizar parcialmente os polissacarídeos nativos e desacetilados. Esta estratégia foi utilizada para a obtenção de produtos de hidrólise enzimática utilizados como ferramenta para a elucidação da estrutura dos polissacarídeos nativos. Os produtos de hidrólise de maior massa molar também foram utilizados para o estudo de diferentes atividades biológicas, como antioxidante, imunomodulatória e anti-inflamatória.

3.3. Polissacarídeos do parênquima de reserva de *Aloe barbadensis*

Um dos primeiros trabalhos voltado à determinação de estruturas de polissacarídeos isolados do gênero *Aloe* foi publicado em 1948 e descreveu a composição do extrato de *A. barbadensis* (EA). Utilizando hidrólise ácida total da fração polissacarídica, foram identificadas massas equimolares de Man e Glc e 2,73% em peso seco de ácidos urônicos (ROBOZ, HAAGEN-SMITH,

1948). Na década de 1960, outro estudo com uma fração parcialmente purificada do EA, identificou além de Man e Glc, traços de Ara, Gal e Xyl (SEGAL, TAYLOR, EOFF, 1968). Em 1978, Waller, Mangiafico e Ritchey isolaram também um polissacarídeo obtido do EA, cuja composição foi Man e Glc.

Gowda, Neelisiddaiah e Anjaneyalu (1979) isolaram quatro polissacarídeos do EA através de precipitações seletivas com etanol, nomeados de A_{1A}, A_{1B}, A₂ e B, que foram identificados como glucomananas parcialmente acetiladas, com diferentes proporções entre as unidades de Glc e Man e grupamentos acetílicos. O trabalho demonstrou que o polissacarídeo B possuía maior conteúdo de O-acetil e que com tratamento alcalino, este perdia a propriedade de formar gel. Este foi o primeiro trabalho a relatar a presença de grupo acetil nesta espécie. A metilação dessas glucomananas mostrou uma estrutural linear com ligações $\beta(1\rightarrow4)$.

Posteriormente, Mandal e Das (1980a) determinaram a estrutura de uma β -D-galactana ramificada em O-6, extraída com água a 100°C, do tecido parenquimático da folha. Esta foi fracionada em coluna de DEAE-celulose, de onde foi obtido um polissacarídeo contendo 92,9% de D-Gal e 3,8% de GalA (Figura 3a) e de massa molar de $3,74 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$.

No mesmo ano, os autores publicaram outro trabalho onde caracterizaram um polissacarídeo, identificado como uma β -D-glucomanana (Figura 3c), extraída da mesma forma com água a 100°C e repetidamente fracionada com cloreto de cálcio e solução de Fehling (MANDAL, DAS, 1980b). Esta glucomanana apresentou uma relação Man:Glc de 22:1 e massa molar de $1,5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$. As análises indicaram que a cadeia principal era formada por Man e Glc (1 $\rightarrow$ 4) ligadas, com ramificação em O-6.

As glucomananas parcialmente acetiladas são os principais polissacarídeos do EA, denominadas de acemanana (FARKAS, 1963; ZHANG, TIZARD, 1996; REYNOLDS, DWECK, 1999; NI et al., 2004) (Figura 3a). Este polímero apresenta cadeias de tamanhos variáveis, formadas por unidades de Man e Glc β -(1 $\rightarrow$ 4) ligadas (LEE, et al., 2001; TURNER et al., 2004).

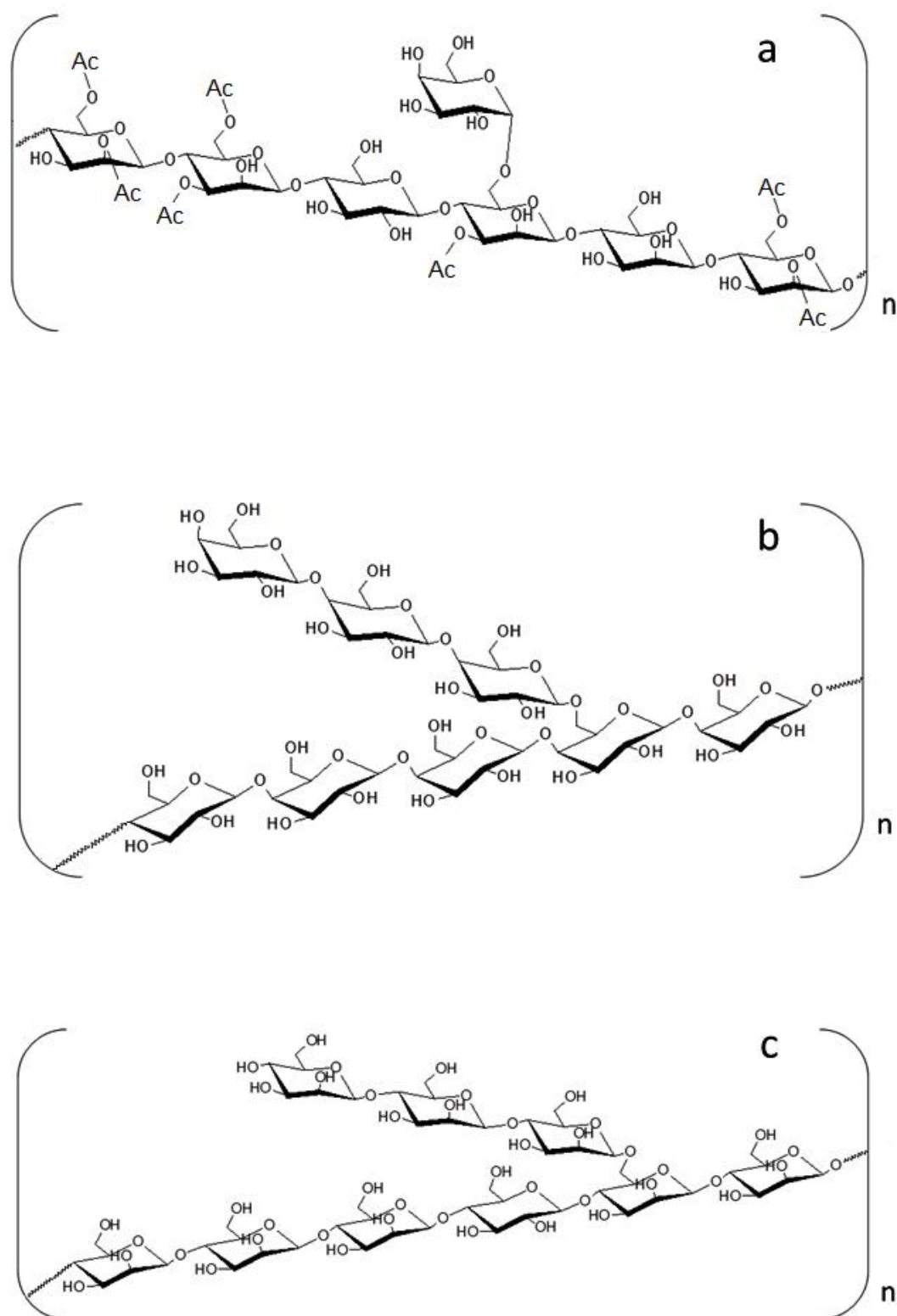


Figura 3 – (a) Representação esquemática proposta para a acemanana, (b) representação esquemática da galactana e (c) representação esquemática da glucomanana isoladas do EA de *A. barbadensis*.

Fonte: Mandal, Das, 1980 a, b; Turner et al., 2004.

Em média, cada manose possui um grupamento acetil em uma das três posições do anel (DIEHL, TEICHMULLER, 1998), característica esta que corrobora para a denominação de acemanana. A razão para esta variação é atribuída às mudanças sazonais e/ou ao efeito da localização geográfica dos cultivos (YARON, 1993; NI et al., 2004; BOZZI, PERRIN, AUSTIN, ARCE VERA, 2007; CAMPESTRINI, 2007). Além da acemanana, outros polissacarídeos têm sido isolados do extrato obtido de folhas de *Aloe*, incluindo arabinanas, xilanas, arabinoramnogalactanas e pectinas (WOZNIEWSKI et al., 1990; MABUSELA, STEPHEN, BOTHA, 1990).

A determinação das posições dos grupos acetil nos polissacarídeos do EA ainda suscita dúvidas. Para a acemanana, foi determinado que os grupamentos acetilicos estariam localizados em C-2/C-3 e C-6 em uma razão de cerca 50:50 (MANNA, McANALLEY, 1993).

Esua e Rauwald (2006) isolaram do EA, extraído da planta em temperatura abaixo de 15°C, três novos compostos de natureza glicídica os quais foram denominados maloil-glucanas por constituírem-se de uma cadeia linear de glucanas substituídas em C-6 por um grupo maloil. Estes compostos de baixa massa molar foram nominadas de veracilglucanas A (monossacarídeo), B (dissacarídeo) e C (hexassacarídeo) (Figura 4).

Estes compostos foram caracterizados como 6-O-(1-L-maloil)- α,β -D-Glcp (veracilglucana A), α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-(1-L-maloil)- α,β -D-Glcp (veracilglucana B) e α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-tetra-[6-O-(1-L-maloil)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)]-6-O-(1-L-maloil)- α,β -D-Glcp (veracilglucana C). Somente uma pequena massa de veracilglucana A pode ser isolada e esta mostrou-se muito instável com o aumento da temperatura. As demais apresentaram estabilidade térmica.

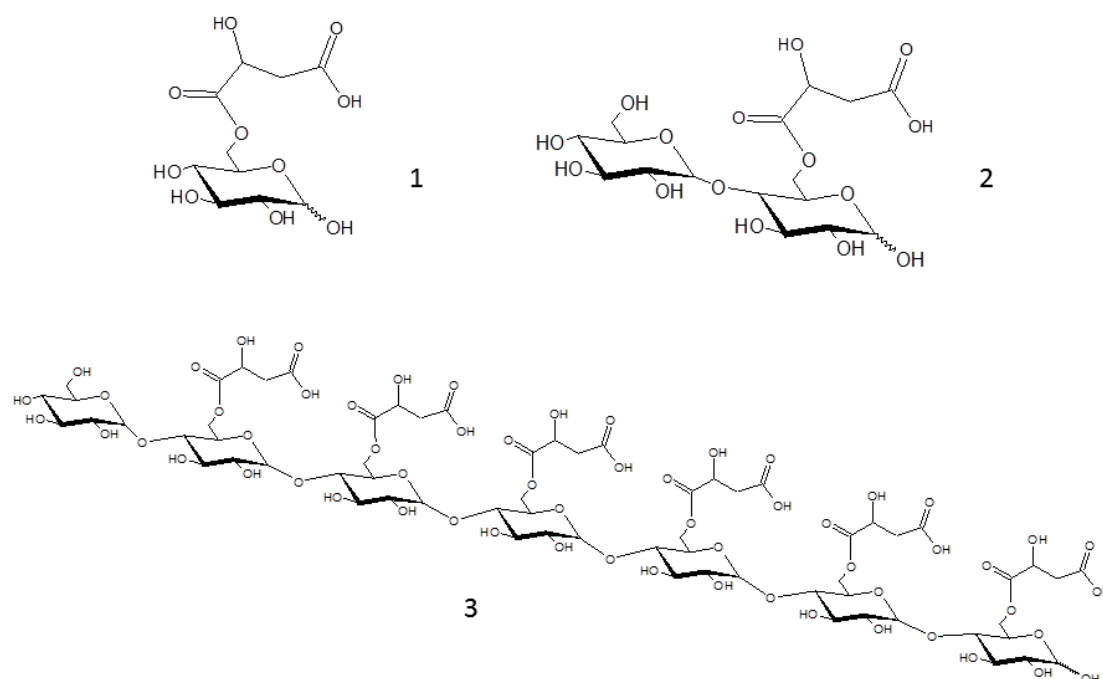


Figura 4 – Representação esquemática das maloilglucanas: veracilglucana A(1), B (2) e C (3), isoladas do EA.

Fonte: Esua, Rauwald, 2006.

Outras espécies de *Aloes* apresentam glucomananos com características químicas semelhantes à *A. barbadensis*. Glucomanas acetiladas são obtidas de *A. vahombe*, *A. arborescens*, cuja razão Man:Glc foram 3:1 e 3,5:1, respectivamente (RADJABI, AMAR, VILKAS, 1983; WOSNIEWSKI, BLASCHECK, FRANZ, 1990).

3.4. Aplicações industriais e propriedades farmacológicas

Embora existam mais de 250 espécies do gênero *Aloe*, somente três ou quatro dessas apresentam relatos na literatura referente a propriedades medicinais, sendo *A. barbadensis* a de maior interesse terapêutico e nutricional (ARAÚJO et al., 1999). As *Aloes* são plantas largamente utilizadas na medicina popular, no tratamento de queimaduras, em diabetes, hepatite, obesidade e no controle das taxas de lipídios no sangue (OKAMURA et al., 1996; VÁSQUEZ et al., 1996; AVILA et al. 1997; SACCÙ, BOGONI, PROCIDA, 2001; BAUTISTA-PÉREZ et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2005) e ainda como agente

cicatrizante, antiulcerativo, antineoplásico e antiviral (KIM, KACEW, LEE, 1999; PAEZ et al., 2000).

As atividades farmacológicas do EA são em sua maior parte atribuídas aos polissacarídeos (REYNOLDS, DWECK, 1999). Sugere-se, entretanto, que o EA exerça atividades terapêuticas por meio da interação sinérgica de seus constituintes (FEMENIA et al., 1999), incluindo alcalóides, saponinas, ácidos graxos, esteróis, minerais, vitaminas (A, C e E), aminoácidos e outros metabólitos secundários como as antraquinonas (YUSUF, AGUNU, DIANA, 2004). Por outro lado, há relatos de que os polissacarídeos exercem atividade anti-tumoral sem qualquer ação sinérgica com outros componentes (FEMENIA et al., 1999).

O EA é largamente utilizado em indústrias cosméticas e farmacêuticas e ainda como suplemento dietético em algumas bebidas (INTERNATIONAL ALOE SCIENCE COUNCIL). As propriedades físico-químicas e reológicas são exploradas industrialmente para a formulação de produtos, sendo que ainda há carência de estudos que caracterizem tanto o EA quando os polissacarídeos isolados.

3.5. Reologia

Segundo Bird, Stewart e Lightfoot (1960) a reologia é a ciência que estuda as propriedades mecânicas dos materiais que determinam seu escoamento quando solicitados por forças externas. É uma ciência que procura definir a relação existente entre o estresse que um dado material apresenta quando a ele é aplicado uma força e a deformação resultante e/ou o escoamento resultante (TABILO-MUNIZAGA, BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; McCLEMENTS, 2008). Atualmente, encontra aplicações principalmente no que tange às análises de alimentos, onde as propriedades particulares, como as organolépticas, que estes apresentam estão intrinsecamente ligadas às suas características reológicas. Além disso, serve como ferramenta durante o processo de fabricação e desenvolvimento de produtos nas indústrias de alimentos e cosméticas (TOLEDO, 1991; STEFFE, 1996; IBARZ, GONÇALVEZ, EXPLUGAS, 1996; SHARMA, MULVANEY, RIZVI, 2000).

3.5.1. Reologia de polímeros

O modelo de placas paralelas auxilia na definição da tensão de cisalhamento e da taxa de cisalhamento (Figura 5).

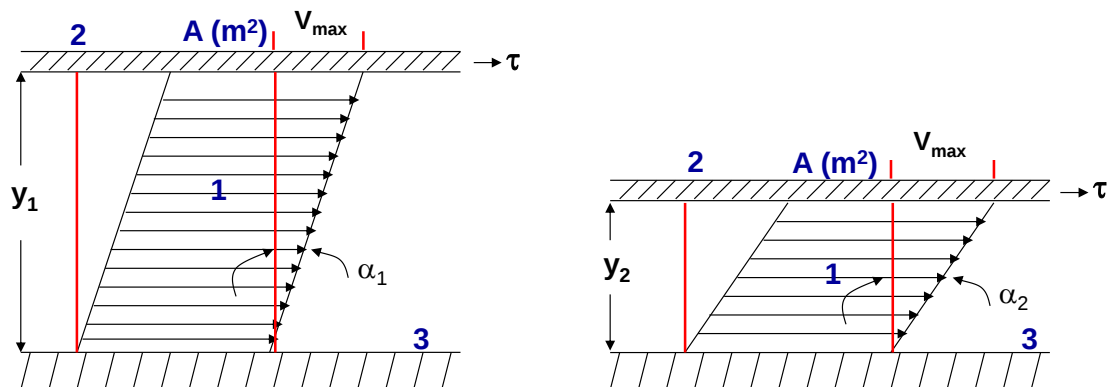


Figura 5 – Modelo de fluxo entre duas placas paralelas, onde 1 – líquido cisalhado; 2 – placa em movimento com área de cisalhamento; 3 – placa estacionária.

Fonte: Schramm, 2006.

Através desse modelo, uma força F aplicada tangencialmente em uma área A da placa superior, gera um fluxo na camada líquida. A velocidade do fluxo que pode ser mantida com uma força constante é controlada pela resistência interna do líquido, ou seja, por sua viscosidade. Com isso a equação que descreve a tensão de cisalhamento (τ) é:

$$\tau = \frac{F}{A} \text{ (Pa)} \quad \text{(Equação 1)}$$

A tensão de cisalhamento, por sua vez, conduz o líquido a uma velocidade V , que é máxima ($V_{\max}$) na camada superior e vai diminuindo até chegar a zero na camada ligada à placa estacionária. Esse gradiente de velocidade gerado no líquido é chamada de taxa de cisalhamento e é definida por uma diferencial da velocidade pela distância (Equação 2):

$$\gamma = \frac{dv}{dy} \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad \text{(Equação 2)}$$

A viscosidade um material como alimentos líquidos depende da temperatura e da composição e pode, também depender da tensão de cisalhamento ou taxa de deformação, do tempo de cisalhamento, assim como do histórico anterior do cisalhamento. A classificação mais geral dos fluidos, que leva em consideração o comportamento da relação tensão de cisalhamento (τ) sobre a taxa de cisalhamento (γ), dada pela equação 3, de Newton.

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \text{ (Pa.s)} \quad \text{(Equação 3)}$$

Assim, esta relação auxilia na classificação e subdivide tais materiais em newtonianos e não-newtonianos (RAO, 1996; STEFFE, 1996).

3.5.2. Fluidos newtonianos

Nos fluidos newtonianos, a tensão de cisalhamento (Equação 4) é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento, de modo que a viscosidade (η) do sistema independe da taxa de cisalhamento e da tensão de cisalhamento, dependendo apenas da composição e temperatura, e o escoamento se inicia assim que a tensão é aplicada (STEFFE, 1996).

$$\tau = \eta \cdot \gamma \text{ (Pa)} \quad \text{(Equação 4)}$$

onde:

τ = tensão de cisalhamento (Pa)

η = viscosidade (Pa.s)

γ = taxa de cisalhamento (s^{-1}).

Isso significa que a viscosidade não é afetada por mudança na taxa de cisalhamento e todos os líquidos para os quais essa afirmação seja verdadeira são chamados líquidos newtonianos como a água, óleo mineral e melaço (SCHRAMM, 2006).

3.5.3. Fluidos não-newtonianos

Os fluidos não-newtonianos são caracterizados por uma relação não-linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento. Ainda, podem ser dependentes ou independentes do tempo (IBARZ, BARBOSA-CÁNOVAS, 1999). Quando trata-se de fluidos não-newtonianos o termo viscosidade é substituído por η_{ap} que é a viscosidade aparente e é função do gradiente de velocidade (VIDAL, 2000). A figura 6 apresenta os perfis de comportamento de fluxo de fluídos.

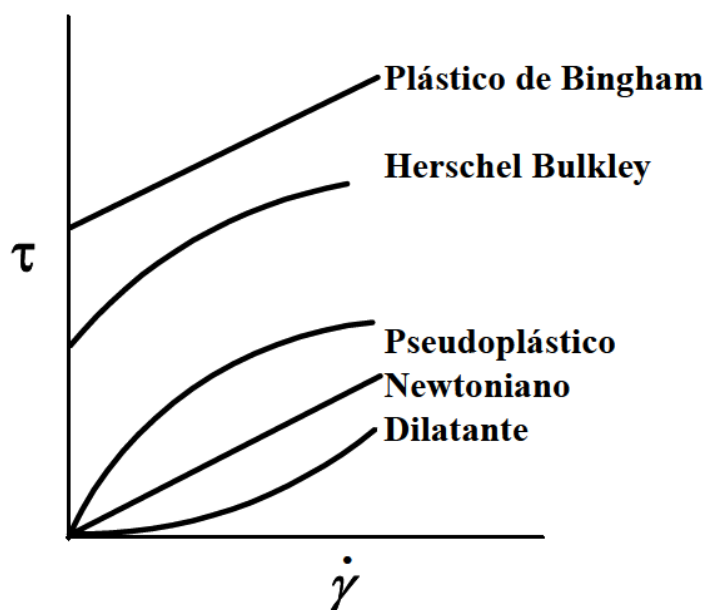


Figura 6 – Comportamentos de fluxo, onde τ = tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento.

Fonte: Sharma, Mulvaney, Rizvi, 2000.

Segundo Steffe (1996) e Rao (1996), os fluídos não-newtonianos podem ser classificados em viscoelásticos e inelásticos. Os fluídos viscoelásticos são aqueles que não apresentam-se como líquidos puros ou

sólidos puros, apresentando características viscosas e parcialmente elásticas (McCLEMENTS, 2008). Dentre os fluídos não-newtonianos inelásticos, destacam-se os reopéticos, tixotrópicos, pseudoplásticos, dilatantes e plásticos de Bingham.

Os fluídos reopéticos são aqueles onde ocorre aumento da viscosidade aparente durante o cisalhamento. Quando esses líquidos são deixados em repouso, eles recuperam sua forma original, ou seja, de baixo nível de viscosidade (SCHRAMM, 2006).

Fluidos do grupo dos tixotrópicos apresentam um comportamento reológico dependente do tempo, no qual a viscosidade aparente diminui com o tempo quando o fluido é submetido a uma taxa de cisalhamento constante. Fluidos desse tipo são conhecidos por conter pequenas partículas (cristais ou biopolímeros). O cisalhamento do material separa as partículas agregadas e então ocorre uma menor resistência ao escoamento e a viscosidade decresce com o tempo até um valor constante ser alcançado (MCCLEMENTS, 2008).

Os fluídos pseudoplásticos são caracterizados pelo decréscimo na viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumenta, sendo que a taxa de cisalhamento versus a tensão de cisalhamento forma uma linha convexa (SHARMA, MULVANEY, RIZVI, 2000; McCLEMENTS, 2008). Esses fluidos em repouso apresentam um estado desordenado, e quando submetidos a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. Quanto maior a tensão aplicada, maior será a ordenação e consequentemente, a viscosidade aparente será menor (HOLDSWORTH, 1971).

Fluidos dilatantes, são aqueles caracterizados pela viscosidade dependente da taxa de cisalhamento, que sob certas condições de tensão ou taxa de cisalhamento apresentam um comportamento de fluxo dilatante. Isto é, a viscosidade aumenta quando a taxa de cisalhamento aumenta (SCHRAMM, 2006).

Os plásticos de Bingham são àqueles que necessitam de uma tensão de cisalhamento inicial para que haja fluxo ou movimentação do material. Uma vez atingida essa tensão, o fluido passa a apresentar um comportamento newtoniano sendo chamado de plástico de Bingham ou plástico ideal. Os fluidos plásticos de Bingham exibem um comportamento semi-sólido não auto-

deformável, mas deformável pela aplicação de uma força superior à força mínima de escoamento (BOBBIO, 1995).

3.5.4. Modelos reológicos

A descrição do comportamento reológico dos materiais pode ser feita através de modelos que relacionam como a tensão de cisalhamento varia com a taxa de cisalhamento. Dentre os modelos matemáticos existentes e que são mais comumente utilizados para sistemas de polissacarídeos estão os modelos de Ostwald-De-Waele (Lei da Potência), Casson e Herschel-Bulkley (HERSCHEL, BULKLEY, 1926; OSTWALD, 1929; CASSON, 1959).

Os modelos reológicos são úteis para relacionar propriedades reológicas de uma solução polimérica com grandezas práticas, como concentração, temperatura, pH e índice de maturação (HAMINIUK, 2005). É indispensável ao controle de qualidade, controle intermediário em linhas de produção e ao projeto no dimensionamento de equipamentos e processos. Dependendo do modelo utilizado, possuem ou não tensão de cisalhamento inicial (VIDAL, 2000).

3.5.4.1. Modelo de Ostwald-De-Waele (Lei da Potência)

Este modelo é bastante utilizado para descrever o comportamento de polissacarídeos em solução e mesmo em alimentos (OSTWALD, 1929; ARANDA-SELVERIO et al., 2010; QUEIROZ et al., 2007; VRIESMANN, SILVEIRA, PETKOWICZ, 2009).

A equação 5, que rege este modelo:

$$\tau = K \gamma^n \text{ (Pa)} \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde:

τ = Tensão de cisalhamento (Pa)

γ = Taxa de cisalhamento (s^{-1})

K = Índice de consistência (Pa.s)

n = Índice de comportamento de fluxo (adimensional)

O desvio de “ n ” da unidade indica o grau de desvio do comportamento newtoniano. Valores de $n < 1$ definem comportamento pseudoplástico. Muitas soluções de polissacarídeos apresentam esse tipo de comportamento.

3.5.4.2. Modelo de Herschel-Bulkley

Este modelo é uma modificação da Lei da Potência, sendo que o diferencial entre eles é a tensão de cisalhamento inicial – Equação 6 (HERSCHEL, BULKLEY, 1926; RAO, COOLEY, 1982). É tido como a relação geral que descreve o comportamento dos fluídos não-newtonianos (STEFFE, 1996).

$$\tau = \tau_{OH} + K_H \dot{\gamma}^{n_H} \text{ (Pa)} \quad \text{(Equação 6)}$$

onde:

τ = Tensão de cisalhamento (Pa)

τ_{OH} = Tensão de cisalhamento inicial (Pa)

K_H = Índice de consistência (Pa.s ^{n})

$\dot{\gamma}$ = Taxa de cisalhamento (s⁻¹)

n_H = Índice do comportamento do fluido (adimensional)

3.5.4.3. Modelo de Casson

O modelo de Casson tem sido usado para alimentos, particularmente para estimar a tensão inicial τ_{OH} , segundo Gehrke (1996). No caso do modelo de Casson (Equação 7), a curva da tensão de cisalhamento versus a taxa de deformação pode ser transformada em uma linha reta pela construção de um gráfico da raiz quadrada da tensão de cisalhamento versus a raiz quadrada da taxa de cisalhamento. Casson (1959) propôs a seguinte expressão matemática:

$$\tau^2 = \tau_{OH}^2 + K_c \gamma^2 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

τ = Tensão de cisalhamento (Pa)

τ_{OH} = Tensão de cisalhamento inicial (Pa)

K_c = Viscosidade plástica de Casson (Pa.s)

γ = Taxa de cisalhamento (s^{-1})

3.5.5. Funções viscoelásticas lineares

3.5.5.1. Ensaio de fluência e recuperação

Este é um teste de viscoelasticidade que permite diferenciar as respostas elásticas das respostas viscosas, também conhecido como “*creep and recovery*” (SCHRAMM, 2006). É também importante para o estudo reológico quando da adição de elementos em uma composição polimérica (DOLZ, HERNANDEZ, DELEGIDO, 2008). O ensaio de fluência e recuperação introduz um parâmetro adicional de tempo de resposta (dependente da tensão) para o comportamento elástico e viscoso de sólidos e fluidos.

O ensaio pode ser entendido a partir da observação da figura 7, onde pode-se explicar o experimento em três etapas:

Em materiais viscoelásticos, a recuperação da deformação aplicada é parcial e controlada pela característica mais elástica ou viscosa da amostra, situando-se em uma posição intermediária entre um sólido e um líquido. Quanto maior for a fase de recuperação, maior será a característica viscoelástica da amostra. Esta técnica permite observar o comportamento viscoelástico de amostras com grande sensibilidade sem significativa perturbação da estrutura intramolecular (FERRY, 1980; TSCHOEGL, 1989; IAGHER, REICHER, GANTER, 2002).

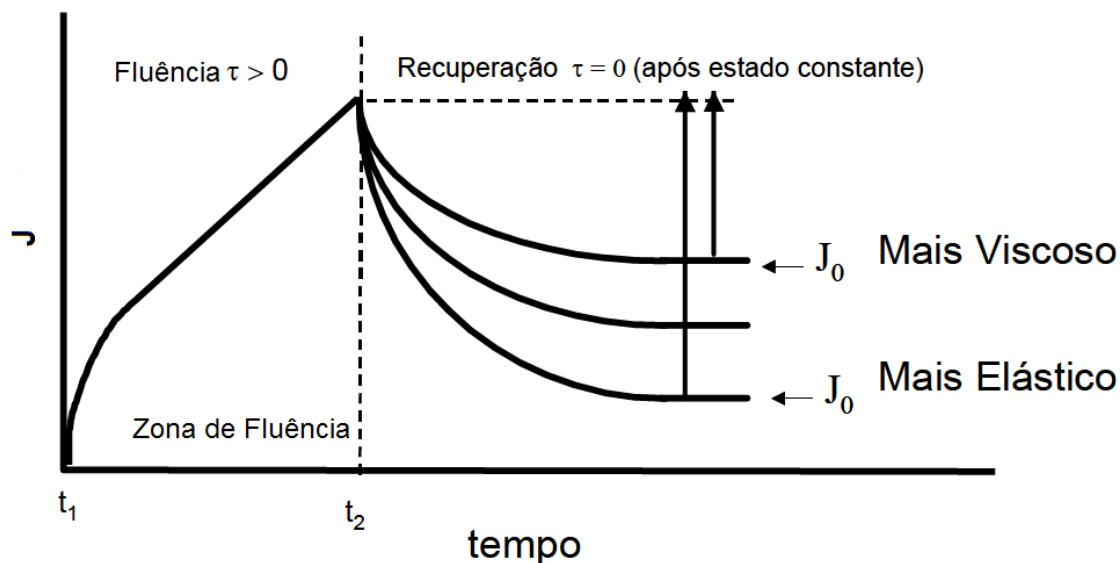


Figura 7 – Teste de fluência e recuperação

Fonte: Ferreira, 2008

Primeiramente acontece uma resposta elástica J_0 seguida de um período de transição em que as propriedades elásticas e viscosas são observadas e finalmente, após um período de tempo a deformação aumenta linearmente e se aproxima de um escoamento estacionário onde a taxa de deformação mantém-se constante (GIBOREAU, CUVELIER, LUNAY, 1994).

Em testes de fluência, a constante de tensão é determinada e o tempo relacionado à deformação é medido (Equação 8). As duas podem ser relacionadas matematicamente por:

$$\gamma(t) = J(t) \cdot \tau \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

τ = Tensão de cisalhamento (Pa)

γ = Taxa de cisalhamento

J = Compliance (Pa^{-1})

A compliance é função material semelhante à viscosidade no fluxo estacionário e define o quão complacente é uma determinada amostra, ou seja,

quanto mais alta for a compliança, mais fácil será deformá-la por uma tensão aplicada (SCHRAMM, 2006).

3.5.6. Testes dinâmicos

Testes dinâmicos oscilatórios são aqueles onde as amostras são submetidas à variação de tensão ou deformação e variam harmonicamente com o tempo. A deformação por cisalhamento pode ser gerada usando placas paralelas ou cone e placa ou cilindro concêntrico. Os instrumentos de teste dinâmico podem ter a tensão controlada, onde a amplitude de tensão é aplicada e a deformação é medida ou podem ter a deformação controlada, onde a amplitude de deformação é aplicada e a tensão é medida (STEFFE, 1996).

Segundo Schramm (2006), os ensaios dinâmicos devem ser realizados dentro de uma faixa de tensão onde o comportamento da amostra é linear. Por definição, esta faixa de tensão onde o módulo dinâmico complexo G^* (módulo que descreve a resposta global de uma amostra a tensões e deformações oscilatórias) e o ângulo de fase δ são independentes da tensão aplicada é chamada de região viscoelástica linear (LIPPACHER, MULLER, MADER, 2004; SCHRAMM, 2006). Dessa forma, determina-se a região de viscoelasticidade linear.

Para sistemas reais de polissacarídeos o grau do caráter sólido e líquido pode ser quantificado. A proporção de pressão em fase com a deformação aplicada é o módulo elástico ou módulo de armazenamento (G'), enquanto que o parâmetro correspondente para a resposta fora de fase é o módulo viscoso ou módulo de perda (G''), os quais são expressos em Pascal (Pa).

O estudo do comportamento viscoelástico dos diferentes sistemas é baseado na dependência de G' e G'' em função da frequência (KAVANAGH, ROSS-MURPHY, 1998; MORRIS, 1995). Nos ensaios oscilatórios, o módulo G' é usado para medir o caráter sólido da amostra, ou seja, quanto maior o valor de G' , maior o caráter sólido da amostra. Já o módulo G'' mede o caráter viscoso da amostra, indicando seu maior ou menor comportamento líquido (WALTER, 1998). No caso de um sólido perfeitamente elástico, toda a energia

é estocada, isto é, G'' é zero. Para um líquido perfeitamente viscoso toda energia é dissipada na forma de calor, isto é, G' é zero (RAO, 1996).

Numa varredura de frequência, a frequência da deformação é aumentada passo a passo. A figura 8 mostra a representação gráfica para sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas.

A figura 8a representa um perfil característico de um gel. O módulo G' é maior que G'' em toda a faixa de frequência utilizada no experimento, isto é, apresenta uma resposta predominantemente sólida, e ambos os módulos G' e G'' são essencialmente independentes da frequência, como esperado para uma rede elástica (KAVANAGH, ROSS-MURPHY, 1998; RAO, 1996; WALTER, 1998). A viscosidade dinâmica complexa η^* diminui linearmente com aumento da frequência (MORRIS, 1995).

Soluções concentradas de polímeros apresentam comportamento de fluxo semelhante ao de um líquido em baixas frequências, onde G'' apresenta maior valor a baixas frequências (Figura 8b). Quando a frequência vai aumentando em relação à reorganização molecular, ocorre distorção da rede, com G' aumentando mais rapidamente que G'' . Deste modo, os módulos tornam-se praticamente iguais e se cruzam em determinado ponto, que é o ponto de geleificação, a partir do qual G' é maior que G'' e há predomínio do caráter sólido (KAVANAGH, ROSS-MURPHY, 1998; MORRIS, 1995).

O comportamento típico de uma solução polimérica diluída é demonstrado na figura 8c, onde o módulo G' é significativamente mais baixo que o módulo G'' , e ambos tendem a zero quando a frequência tende a zero.

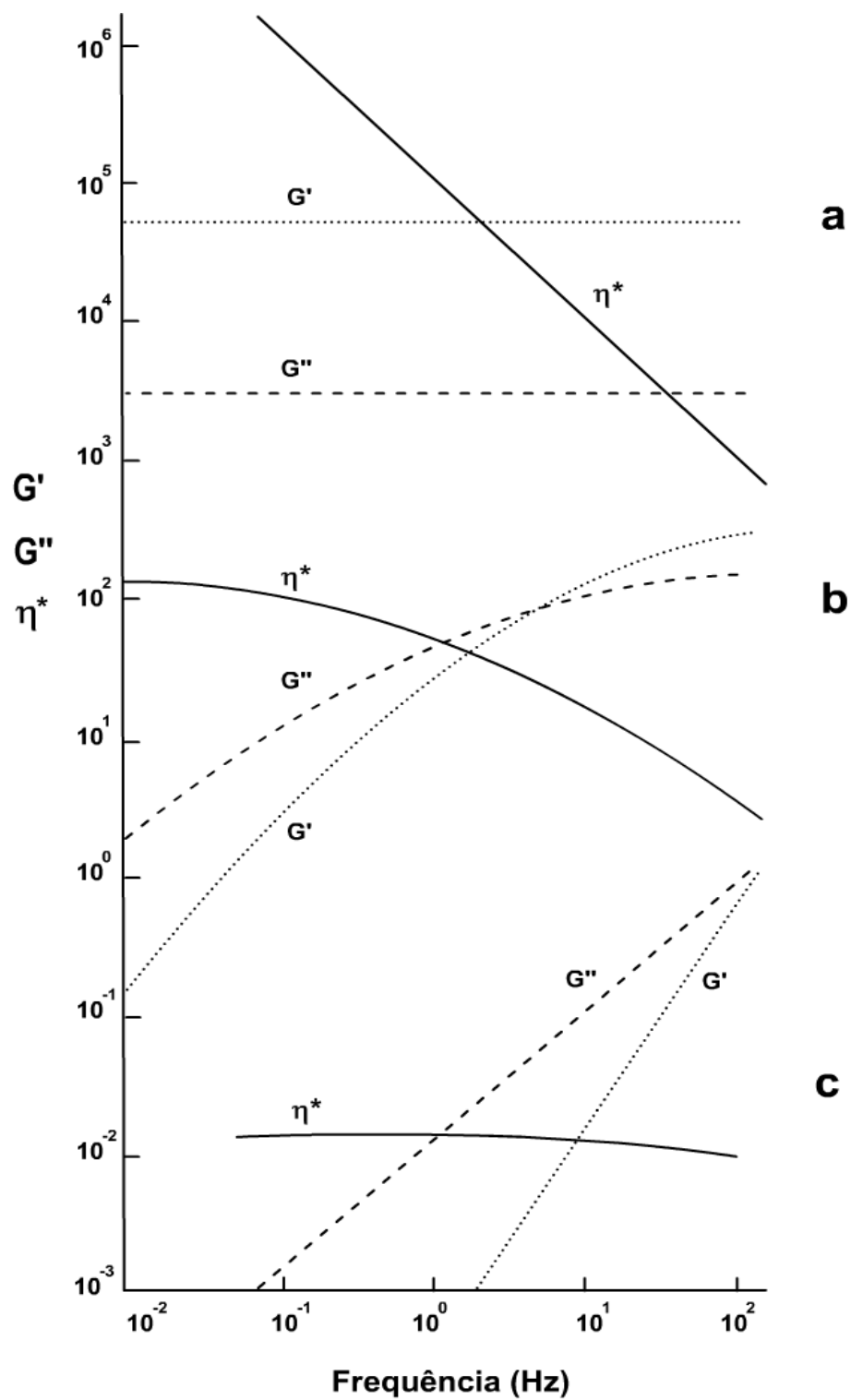


Figura 8 – Representação gráfica de sistemas polissacarídicos típicos: (a) gel forte; (b) solução concentrada; (c) solução diluída.

Fonte: Morris, 1995

Em baixas frequências predomina o movimento translacional, onde a energia é dissipada por entre o solvente. Em frequências mais altas, ocorre maior movimento de contorção das cadeias e armazenamento de energia, e G' aproxima-se de G'' . A viscosidade dinâmica complexa η^* , que descreve a resistência total para uma medida dinâmica, apresenta um comportamento essencialmente linear com o aumento da frequência (MORRIS, 1995).

3.5.7. Reologia de polissacarídeos

Muitos estudos sobre o comportamento reológico de polissacarídeos de fontes vegetais vem sendo realizados. Dentre eles destacam-se aqueles obtidos de frutos (CABRAL, QUEIROZ, FIGUEIREDO, 2002; IAGHER, REICHER, GANTER, 2002; VRIESMANN, SILVEIRA, PETKOWICZ, 2009; VRIESMANN, SILVEIRA, PETKOWICZ, 2010), sementes (GUO et al., 2009), gomas de exsudatos (De PAULA; RODRIGUES, 1995; RINCÓN et al., 2009; SIMAS-TOSIN et al., 2010) e tubérculos (GAO, NISHINARI, 2004; RATCLIFFE et al., 2005; ZHANG, XIE, GAN, 2005; PENROJ et al., 2005), e uma vez conhecidas as propriedades dos polissacarídeos em solução é necessário compreender o seu comportamento nas diferentes aplicações (XU et al., 2009).

Dentre os vegetais, os estudos reológicos sobre a solução aquosa gerada a partir do parênquima de reserva de *A. barbadensis* cultivada em Negev região de Israel (YARON, 1993) e Coquimbo – Chile (OPAZO-NAVARRETE et al., 2012) foram investigados. Yaron (1993) propôs que o fluido fresco viscoso de Aloe apresenta comportamento pseudoplástico, no entanto as propriedades de fluxo Newtonianos foram obtidos após a armazenagem da mucilagem, à temperatura ambiente ou a incubação a 40 ° C durante 48 h. Opazo-Navarrete e colaboradores (2012) relataram que a solução de Aloe se comporta como um sólido ($G' > G''$) durante o armazenamento a 4 °C. Alguns autores (YARON, 1993; BOZZI et al., 2007; CAMPESTRINI, 2007) descreveram que a variabilidade das propriedades reológicas podem ser atribuídas a diferenças na fonte da planta, as condições de horticultura, sazonalidade e/ou tratamento pós-colheita. Trabalho recente, em que o EA foi avaliado nas temperaturas de 15, 30 e 45°C, mostrou que este manteve sua característica elástica na faixa de 1 a 10 Hz e que EA exibiu um

comportamento pseudoplástico em baixas taxas de cisalhamento (LAD, MURTHY, 2012).

Além destas diferenças, os produtos obtidos a partir de *A. barbadensis* são frequentemente submetidos a diferentes tipos de processamento, por exemplo, aquecimento ou desidratação, o que pode modificar de forma irreversível as características das estruturas de polissacarídeos tais como o grau de acetilação, da massa molar e da remoção das cadeias laterais. Essas modificações podem originar mudanças nas atividades biológicas e comportamento reológico dos polímeros (FEMENIA et al., 2003).

3.6. Aspectos relacionados às propriedades antioxidantes

3.6.1. Estresse oxidativo e radicais livres

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, que leva aos danos celulares pelos radicais livres é chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993). A definição de estresse oxidativo tem sido reformulada para esclarecer dois resultados mecanísticos diferentes: danos macromoleculares e interrupções do circuito redox de tiol, o que leva à sinalização celular aberrante e controle redox disfuncional. O dano macromolecular é geralmente considerado em termos de mecanismos oxidativos ligado aos radicais livres (JONES, 2008). Este estresse está diretamente ligado à incidência de doenças degenerativas, câncer, aterosclerose, reumatismo, envelhecimento entre outras (PRYOR, 1986; ANDERSON, 1996; HALLIWELL, 2009; VALKO et al., 2007).

Espécies reativas são moléculas pequenas e difusíveis ou átomos que contém um ou mais elétrons desemparelhados ou não-pareados em seu orbital. São altamente instáveis, de curta meia-vida entre mili-, micro- ou nano segundos e muito reativos quimicamente, o que determina que se combinam com qualquer molécula que entrar em contato (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; DEVASAGAYAM et al, 2004; JONES, 2008). Segundo Devasagayam e colaboradores (2004), o termo radical livre é usado em sentido amplo, incluindo também as espécies reativas nas quais os “estados de excitação” levam à geração de radicais livres. Podem participar de reações em cadeia em que um único radical livre pode iniciar o evento causando a propagação da reação e

assim danificar múltiplas moléculas no ambiente químico onde se faz presente (JONES, 2008).

As espécies reativas são em geral, gerados no ambiente mitocondrial, citoplasmático ou em nível de membrana plasmática e podem atacar DNA e demais macromoléculas, como os carboidratos, lipídeos e proteínas (ANDERSON, 1996). Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), as mitocôndrias são as organelas em que as espécies reativas são majoritariamente formados, principalmente o ânion superóxido e por isso, também desenvolveram mecanismos pelos quais essas espécies são neutralizadas. Além das espécies reativas livres serem produzidos por processos fisiológicos normais, elas podem ser produzidas devido à influência de espécies exógenas ao corpo. Estas espécies exógenas podem ser compostos que ocorrem naturalmente na biosfera como o ozônio, NO_2 , etanol ou produtos químicos industriais que são sintetizados pelo homem (por exemplo, tetracloreto de carbono), ou xenobióticos que são derivados das atividades humanas (por exemplo, benzo [α] pireno) (PRYOR, 1986).

As espécies rativas livres de importância em organismos vivos incluem hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), e peroxil ($\text{RO}_2^\bullet$). Peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete $^1\Delta\text{g}$ (muitas vezes escrito como $^1\text{O}_2$) e ozônio (O_3) não são espécies rativas livres, mas podem facilmente levar a reações de espécies reativas livres em organismos vivos, sendo consideradas espécies reativas (ARUOMA, 1998).

O termo “espécies reativas” é frequentemente utilizado na designação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Estas são altamente reativas, mas que não apresentam desemparelhamento de elétrons sendo também compostos oxidantes (BAST, HAENEN, DOELMAN, 1991; HALLIWELL, 1996) (Tabela 2).

Tabela 2 – Espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) de interesse biológico.

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

Fonte: DEVASAGAYAM et al., 2004

As EROs são formadas pela redução parcial do oxigênio até água, através de sucessivas reações (Figura 9).

O $O_2^{\bullet -}$ é formado pela redução univalente do oxigênio molecular (O_2). Esse processo é mediado por enzimas tais como NADPH oxidases, xantina oxidase e citocromo P-450 ou não enzimaticamente por compostos redox-reativos tais como semi-ubiquinona, componente da cadeia transportadora de

elétrons mitocondrial. Em condições fisiológicas cerca de 1 a 3% de moléculas de oxigênio são convertidas em radical $O_2^{\bullet-}$ na mitocôndria.

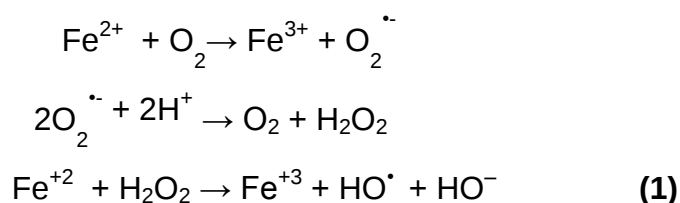


Figura 9 – Conversão do oxigênio molecular à água.

Fonte: SOUZA, 2010.

A enzima superóxido dismutase (SOD) converte enzimaticamente o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Em tecidos biológicos, o $O_2^{\bullet-}$ pode ser convertido não enzimaticamente às espécies não radicalares H_2O_2 e $^1\Delta_g$ (DRÖGE, 2002; VALKO et al., 2004).

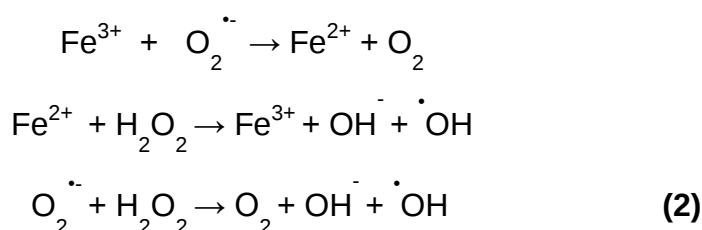
O radical $HO^{\bullet}$ é um dos mais prejudiciais ao organismo, pois possui alta reatividade e ataca as moléculas por retirar hidrogênios e por adicionar ligações insaturadas. A formação do radical $HO^{\bullet}$ se dá pela reação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que isoladamente no meio celular é praticamente inócuo e se difunde pela membrana celular, com metais de transição, geralmente Fe^{+2} e Cu^{+2} . O Fe^{+2} é um dos íons mais biodisponíveis, sendo encontrado na hemoglobina, além de proteínas de transporte (transferrina) e armazenamento (ferritina e hemosiderina). A reação do Fe^{+2} com o H_2O_2 é conhecida como processo Fenton (1).



Outra via de formação do radical $HO^{\bullet}$ é a homólise da água pela exposição à radiação ionizante. A radiação ultravioleta produz radicais $HO^{\bullet}$ nas

células da pele e a radiação gama e os raios X produzem radicais $\text{HO}^\bullet$ no local onde incidem (processo Foto-Fenton). Todos esses fatores podem causar alterações e mutações gênicas provocando inúmeros tipos de doenças (HUSAIN, CILLARD, CILLARD, 1987; HALLIWELL, 1992).

Através da redução de Fe^{+3} , formando íons Fe^{2+} ou facilitando a biodisponibilização de Fe^{+2} através da liberação deste das proteínas transportadoras e armazenadoras, o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) auxilia na formação dos radicais $\text{HO}^\bullet$ por meio da reação de Haber-Weiss (2) (HALLIWELL, 1992; KEHRER, 2000).



Em um organismo saudável, a geração de pró-oxidantes na forma de EROs e ERNs são eficazmente postas em xeque por vários níveis de defesa antioxidante. Quando fica exposto à ambientes adversos ou agentes patológicos como atmosfera poluída, fumaça de cigarro, raios ultra-violeta, radiações, produtos químicos, este equilíbrio delicadamente mantido é deslocado em favor dos pró-oxidantes, resultando em estresse oxidativo (DEVASAGAYAM et al., 2004).

3.6.2. Defesas antioxidantes

Segundo Sies e Stahl (1995) e Halliwell e Gutteridge (1999), um composto com propriedade antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz.

Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SIES, 1993).

Entretanto, Halliwell e Gutteridge (1999), definem que o termo é implicitamente restrito a um antioxidante que quebre a cadeia de eventos oxidativos. Para estes autores, os antioxidantes podem agir em diferentes níveis na sequência oxidativa e assim sendo, sua atuação poderia ser em:

1. Diminuir a concentração de O_2 localizada;
2. Prevenir a iniciação do primeiro evento oxidativo pela captação do radical iniciante como o $\bullet OH$;
3. Ligar-se a íons metálicos de forma que não haveria a geração de espécies iniciantes e/ou não haveria a decomposição dos peróxidos lipídeos a peroxil ou radicais alcóxi;
4. Decompor peróxidos pela sua conversão a produtos não-radicalares como álcoois;
5. Quebrar a cadeia, isto é, captar os radicais intermediários como o peroxil e radicais alcóxi para prevenir a continuada abstração do hidrogênio. Os bloqueadores da progressão da cadeia são frequentemente os compostos fenólicos e as aminas aromáticas.

3.6.2.1. Defesas enzimáticas

Os mecanismos de defesa evoluíram nos organismos a fim de limitar os níveis de espécies reativas de oxigênio e o dano que eles induzem (ANDERSON, 1996). Esses mecanismos evolutivos incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), encontrada no citosol e na mitocôndria, que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ainda, as catalases, como a peroxissomal-oxidase, que removem o peróxido de hidrogênio formado, encontradas nos peroxissomos e em muitos tecidos (CHANCE, SIES, BOVERIS, 1979). Glutathione transferase e glutathione peroxidases são geralmente associadas à desintoxicação por conjugação à xenobióticos eletrófilos (KETTER, MEYER, 1989).

A glutathione reductase (GSH-rd) é a enzima capaz de reduzir a glutathione oxidada (GSSG) em sua forma reduzida (GSH), uma etapa importante para a integridade do sistema celular (GILBERT, McLEAN, 1990). Uma vez que a taxa de GSH/GSSH em células normais é alta, cabe a GSH-rd

é uma flavoproteína dependente de NADPH e portanto, dependente também da via das pentoses, manter esta relação (HALLIWELL, GUTERIDGE, 1999).

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois a custa da conversão de GSH em GSSG (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Esta enzima é específica para GSH como um doador de hidrogênio, mas também aceita outros peróxidos assim como peróxido de hidrogênio (HALLIWELL, GUTERIDGE, 1999).

Assim como as peroxidases, a catalase também remove o peróxido de hidrogênio, gerando água e O_2 (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). A catalase (CAT) está majoritariamente localizada em organelas conhecidas como peroxissomas, que contêm várias enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio, e também no citosol (WARD, PETERS, 1995). Está presente nos principais órgãos do corpo, majoritariamente concentrada no fígado sendo que em outros tecidos como o muscular cardíaco e esquelético e também o nervoso apresentam concentrações menores de CAT e estão, portanto, mais expostos aos danos provocados pelos radicais livres (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

A superóxido dismutase (SOD) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD: a forma SOD-cobre-zinco que está presente primariamente no citosol, e a forma SOD-manganes que está localizada no citosol (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). A SOD é uma enzima presente em todos os organismos aeróbios, que tem como papel biológico catalisar a dismutação de íons superóxido em O_2 e H_2O_2 (FRIDOVICH, 1997). Esta reação pode ocorrer de modo espontâneo em pH fisiológico, porém quando a SOD está presente, a velocidade desta reação é 10^4 vezes maior (YU, 1994).

3.6.2.2. Defesas não enzimáticas

Dentre as defesas antioxidantes não enzimáticas é possível listar algumas vitaminas, compostos fenólicos e minerais (FERREIRA,

MATSUBARA, 1997; BIANCHI, ANTUNES, 1999; SHARIFIFAR, DEHGHN, MIRTAJALDINI, 2009).

A vitamina C ou ácido ascórbico participa na regeneração do α -tocoferol, presente nas membranas e também como captadora de radicais livres (HALLIWELL, 2001). É um importante antioxidante na ausência de metais de transição, enquanto que na presença destes, possui propriedades pró-oxidantes (RIETJENS et al., 2002).

A vitamina E ou α -tocoferol é uma vitamina lipossolúvel e está presente nas membranas celulares, nas mitocôndrias e em lipoproteínas plasmáticas. É considerado um potente antioxidante, possuindo a propriedade de finalizar a propagação de reações dos radicais livres nas membranas lipídicas, pois seu grupamento fenólico rapidamente elimina radicais peroxil, convertendo-os em radicais tocoferoxila, que tem capacidade muito menor de continuar a lipoperoxidação (KOLLECK, SINHA, RÜSTOW, 2002; MacDONALD-WICKS, GARG, 2003).

A vitamina A e seu precursor, o β -caroteno são também considerados antioxidantes. Assim como os demais carotenoides eles podem proteger os lipídios contra a peroxidação, por reagirem com radicais peroxil e alcóxil (BAST, HAENEN, 2002).

A glutathione é outro importante antioxidante não enzimático que participa de reações de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e a glutathione transferase. Sua ação antioxidante se deve à presença de um grupamento sulfidril, que atua como doador de elétrons (YU, 1994; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; BLOKHINA, VIROLAINEN, FAGERSTEDT, 2003).

Os antioxidantes sintéticos são os mais utilizados pela indústria alimentícia e cosmética, sendo exemplos o BHT (butil-hidróxi-tolueno), o BHA (butil-hidróxi-anisol) e o propilgalato (FKI, ALLOUCHE, SAYADI, 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2009) e o Food and Drug Administration – FDA (2012) consideram seguros o uso destes compostos, entretanto, estudos indicam que estes antioxidantes podem oferecer danos à saúde, quando utilizados durante longos períodos ou ainda quando as concentrações superam àquelas consideradas seguras ao seu uso (ITO, FUKUSHIMA, HAGIWARA, 1983; HIROSE et al., 1986).

Diante disso, diversos vegetais têm sido estudados como fontes de antioxidantes naturais que poderiam substituir os antioxidantes artificiais ou de diminuir sua quantidade nos alimentos (MOURE et al., 2001; SOARES, 2002).

Estudos mostram que radicais livres como o $\cdot\text{OH}$ reagem com carboidratos, abstraindo aleatoriamente um átomo de hidrogênio ligado aos átomos de carbono, produzindo um radical carbono-centrado (DEVASAGAYAM et al., 2004). Isto leva à quebra de cadeias importantes em organismos animais, como por exemplo, do ácido hialurônico presente no líquido sinovial nas articulações (DEVASAGAYAM et al., 2004).

Os estudos com polissacarídeos de origem fúngica, algal e vegetal têm sido realizados, visando descobrir as possíveis atividades antioxidantes ligadas a essas moléculas (JIANG et al., 2005; SOUZA et al., 2007; CAPEK, MACHOVÁ, TURJAN, 2009; YOUNGUO, ZONGLI, XIAOPING, 2009). A atividade antioxidante atribuída a polissacarídeos mostra que a composição química e o tipo de ligação são determinantes para a atividade (IM et al., 2005). Atividades antioxidantes significativas são obtidas com polissacarídeos e oligossacarídeos modificados, como as k-carragenanas e seus oligossacarídeos derivados. Estes foram per sulfatados, acetilados e fosforilados e testados quanto à atividade antioxidante, resultando em aumento dessa atividade independente da massa molar (YUAN et al., 2005).

3.7. Aspectos relacionados às propriedades como agentes imunomoduladores

3.7.1. Macrófagos

Macrófagos são células diferenciadas da linhagem fagocítica mononuclear, resultantes do amadurecimento dos monócitos. Estes se estabelecem nos tecidos linfoides e não-linfóides, sendo relacionados com a homeostase tecidual e importantes na resposta imune inata, nas fases iniciais não-adaptativas de defesa do hospedeiro, como células apresentadoras de antígenos e como células efectoras na imunidade humoral e celular (GORDON, TAYLOR, 2005; JANEWAY et al., 2007; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008; POLLARD, 2009; GEISSMANN et al., 2010).

Além das funções primárias de defesa, os macrófagos estão envolvidos em diferentes processos como a remodelagem tecidual durante a embriogênese, reparação de ferimentos, remoção de células senescentes ou danificadas subsequentes à injúria ou infecção, assim como na hematopoiese (GORDON, 2002; KLIMP et al., 2002).

Durante o processo fagocítico, os macrófagos podem reconhecer os patógenos devido à presença de receptores como o receptor para D-manose. Estas células de defesa identificam estas unidades glicídicas expressas na superfície de bactérias, por exemplo, permitindo o reconhecimento por parte dos macrófagos de agentes patogênicos (STAHL et al., 1980; SHEPHERD et al., 1981; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

3.7.2. Produtos do metabolismo de macrófagos: óxido nítrico

O óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) é uma molécula gasosa, pequena, instável, potencialmente tóxica e altamente difusível através das membranas celulares (COULTER et al., 2008). Possui ação importante na defesa contra agentes microbianos, no processo inflamatório e angiogênese (MacMICKING, XIE, NATHAN, 1997). Nos macrófagos, sua principal função é microbicida. Dentro dos fagolisossomos combina-se com o peróxido de hidrogênio formando o peroxinitrito, sendo assim, tóxico aos microorganismos (SONG et al., 2002; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

Em mamíferos, são conhecidas três isoformas distintas de óxido nítrico sintase (NOS): neuronal (n) NOS, induzível (i)NOS e endotelial (e)NOS (FORSTERMANN et al., 2003). As isoformas nNOS e eNOS são expressas em neurônios e células endoteliais, respectivamente. Elas são Ca^{2+} -dependente e expressas de forma constitutiva nestas células. Em contraste, a isoforma iNOS é Ca^{2+} -independente e é expressa nos macrófagos após estímulo adequado, como aquele causado pelo fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e outros agentes como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (FANG, 2004; MONCADA, 1999).

O $\text{NO}^\bullet$ possui ação importante na defesa contra agentes microbianos, no processo inflamatório e angiogênese (MacMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

Nos macrófagos, sua principal função é microbicida. Dentro dos fagolisossomos combina-se com o peróxido de hidrogênio formando o peroxinitrito, sendo assim, tóxico aos microorganismos (SONG et al., 2002; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). NO[•] produzido por iNOS foi descrito para ter microbicida benéfico, antiviral, antiparasital, e antitumoral efeitos (BOGDAN, 2001; MacMICKING; XIE; NATHAN, 1997). No entanto, a expressão da iNOS aberrante parece estar envolvido na patofisiologia das doenças humanas, tais como asma, artrite, esclerose múltipla, colite, psoríase, doenças neurodegenerativas, no desenvolvimento de tumores, rejeição de transplante ou choque séptico (BOGDAN, 2001; KRÖNCKE, FEHSEL, KOLB-BACHOFEN, 1998).

3.7.3. Citocinas

Citocinas são proteínas secretadas pelas células do sistema imune, como os macrófagos e são produzidas em resposta à presença de patógenos e outros antígenos. Estão envolvidas em numerosos processos, como o crescimento, diferenciação e ativação celular e ainda regulam e determinam a natureza da resposta imune. Diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação (BERCZI, SZENTIVANYI, 2003; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010).

O TNF (fator de necrose tumoral) é uma citocina pró-inflamatória, produzida por células fagocíticas mononucleares (macrófagos) ativadas, neutrófilos, linfócitos, células *Natural Killer*, células endoteliais, mastócitos e outras (BERCZI, SZENTIVANYI, 2003; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010). É reconhecido como um mediador importante numa variedade de processos fisiológico e imunológicos (Figura 10), sendo o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e outros microorganismos infecciosos (STRIETER et al., 1988; STENVINKEL et al., 2005; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008). Foi originalmente descrito como um fator produzido por animais que eram tratados com LPS, induzindo necrose hemorrágica de tumores.

Ao nível celular, o TNF tem efeitos pleomórficos significativos sobre as células e coordenam os processos inflamatórios; incluindo células endoteliais, fibroblastos, leucócitos polimorfonucleares, monócitos do sangue, macrófagos, adipócitos, linfócitos e osteoclastos (STRIETER et al., 1988).

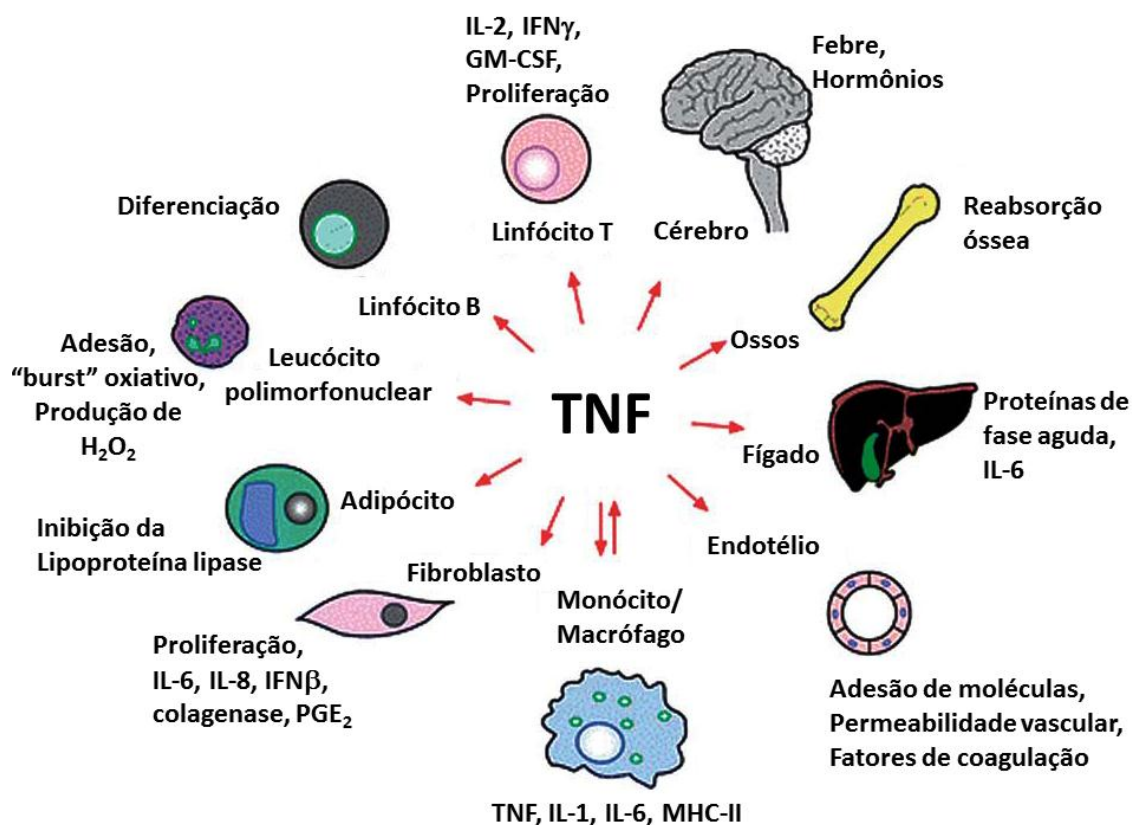


Figura 10 – Atividades biológicas do fator de necrose tumoral (TNF) nas diferentes células e tecidos.

Fonte: Branschädel, Boschert, Krippner-Heidenreich, 2007.

A maioria das células humanas têm uma elevada afinidade pelos sítios de ligação para TNF- α . Primeiramente as duas proteínas receptoras de TNF- α foram descritas como tipo A, com 100 kDa, e tipo B de 75 kDa (HOHMANN et al., 1990). Atualmente, são descritos como tipo 1 de 55 kDa (TNF-RI) e tipo 2 de 75 kDa (TNF-RII) (BRANSCHÄDEL, BOSCHERT, KRIPPNER-HEIDENREICH, 2007; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

Os membros da superfamília de TNF têm distintos domínios citoplasmáticos de morte que pode induzir a apoptose, bem como os

receptores sem aparente homologia na cauda citoplasmática. Este último grupo de receptores é envolvido na ativação de genes e anti-apoptótico de sinalização (VINAY, KWON, 2009).

Interleucina-1 (IL-1), que, como o seu nome sugere foi a primeira interleucina a ser descrita em meados da década de 1980. Durante a última década, vários outros membros da família IL-1 têm sido identificados, e os seus papéis importantes na resposta imune inata e adaptativa foram revelados. A família IL-1 compreende 11 membros: IL-1 α , IL-1 β e antagonistas do receptor IL-1 (IL-1ra). Age em conjunto com o TNF na imunidade natural e na inflamação, sendo produzida principalmente por macrófagos e também por outras células como os neutrófilos, células epiteliais e endoteliais. Quando secretada em baixas concentrações, atua como mediador da inflamação, já em altas concentrações, exerce efeitos endócrinos, induz a febre e a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado (BERCZI, SZENTIVANYI, 2003; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

A interleucina 10 (IL-10) é produzida por células T, B, monócitos e queratinócitos ativados. IL-10 é uma proteína de 18 kDa que inibe a produção de um número de citocinas, incluindo IL-2, IL-3, IFN- γ , e TNF- α . Sendo portanto uma grande inibidora da imunidade celular principalmente de macrófagos e de células dendríticas ativadas, favorece o desenvolvimento da resposta dos anticorpos por supressão da interleucina 12. IL-10 regula o crescimento e diferenciação de células B, células T helper, T citotóxicos, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais. Desempenha um papel-chave na diferenciação e na função de células T reguladoras sendo assim, uma potente moduladora da imunidade natural e da imunidade mediada por células (BERCZI, SZENTIVANYI, 2003; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010). IL-10 forma um homodímero e exerce a sua função biológica através de um complexo de receptores IL-10R1 e IL-10R2. IL-10 inibe a produção de IFN- γ por linfócitos T *helper* 1 (T_H1); IL-4 e IL-5 por linfócitos T *helper* 2 (T_H2); IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-12, e TNF- α por fagócitos mononucleares; e IFN- γ e TNF- α por células NK (COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010).

IL-6 (interleucina 6), foi inicialmente descrita como um fator de diferenciação de células B, mas atualmente é conhecido por estimular o crescimento e diferenciação de células T, induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos, a síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos, exerce ações sobre os queratinócitos, células mesangiais, células-tronco hematopoiéticas e promove o desenvolvimento de osteoclastos. As células fagocíticas mononucleares são a fonte mais importante de IL-6, no entanto, também é produzida por linfócitos T e B, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e medula óssea (BERCZI, SZENTIVANYI, 2003; KISHIMOTO, 2005; ARA, DeCLERCK, 2010; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010).

As funções da IL-6 são as de contribuir para a resposta de fase aguda, estimular a produção de neutrófilos pela medula óssea. Já na imunidade adquirida, estimula o crescimento dos linfócitos B que se diferenciaram em produtores de anticorpos, estimula a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias como a IL-17 e inibe a geração e ação de células reguladoras (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008, MIMA, NISHIMOTO, 2006; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010).

3.8. Aspectos relacionados ao processo inflamatório

O processo inflamatório é uma resposta a estímulo lesivo, sendo evocado por ampla variedade de agentes nocivos. A capacidade de induzir uma resposta inflamatória é essencial à sobrevivência frente aos patógenos e agressões ambientais (MEDZHITOV, 2008; BRUNTON et al., 2010). O desencadeamento deste processo pode se dar através de agentes, denominados flogênicos físicos ou químicos. Dentre os fatores físicos pode-se citar queimadura ou congelamento, traumas, radiações UV, fraturas. Como exemplos de agentes químicos, pode-se citar os ácidos, bases, óleos e alguns polissacarídeos como a carragena. Pode ainda ser desencadeado por agentes biológicos como bactérias, fungos e vírus (CARVALHO, 2004).

A inflamação tem três papéis fundamentais no combate às infecções. O primeiro é o de oferecer células e moléculas efetoras adicionais aos sítios de infecção para aumentar a morte dos microorganismos invasores por

macrófagos. O segundo é o de proporcionar uma barreira física, na forma de coagulação microvascular, para prevenir a propagação da infecção. O terceiro é o de promover o reparo dos tecidos danificados, uma tarefa não imunológica (JANEWAY et al., 2007).

As características clássicas de inflamação, como descrito por Celsus de “rubor” (vermelhidão), “tumor” (edema), “dolor” (dor), e calor são as manifestações sintomáticas nos tecidos em respostas a estímulos nocivos, tais como patógenos invasores, danos celulares e outros irritantes. As inflamações agudas e crônicas são caracterizadas por vários processos fundamentais, incluindo a exsudação de proteínas do plasma, o recrutamento de leucócitos, e ativação celular e presença de mediadores do processo inflamatório no plasma. Em geral, este processo é auto limitante e conduz a um retorno do tecido e órgãos, para um estado normal tanto estrutural e funcional (LARSEN, HOLT, 2000; MANICONE, McGUIRE, 2008).

A volta à normalidade envolve a neutralização e eliminação do agente agressor, normalização da permeabilidade vascular, cessação da infiltração leucocitária, apoptose dos neutrófilos presentes no sítio inflamatório e remoção dos corpos apoptóticos, corpos estranhos e “debris” celulares, eventos nos quais os macrófagos exercem um papel importante, reconhecendo e fagocitando os neutrófilos apoptóticos de maneira não flogística (GILROY et al., 2004; KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2007; WEIGERT, JENNEWEIN, BRÜNE, 2009). Portanto, os processos de apoptose e fagocitose são importantes durante a fase resolutive do processo inflamatório. De fato, evidências sugerem que falhas nos processos de apoptose podem ser um fator importante na patogênese e progressão de diversas doenças (GILROY et al., 2004).

3.8.1. Mediadores do processo inflamatório

O recrutamento de células inflamatórias para os locais de lesão envolve interações em concerto de vários tipos de mediadores solúveis, como o fator C5a do complemento, o fator de ativação plaquetário (PAF) e o eicosanoide LTB₄, que podem agir como agonistas quimiotáticos. Além destes, as citocinas IL-1, o TNF- α desempenham papéis essenciais na orquestração do processo inflamatório, uma vez que são considerados os

principais mediadores das respostas biológicas ao LPS bacteriano (BRUNTON et al., 2010).

Os sinais clínicos do processo inflamatório são ocasionados devido ao aumento da permeabilidade vascular com consequente extravasamento de fluído para a área lesionada. Este processo é desencadeado através de mediadores químicos, que podem ser de origem plasmática ou celular. Os mediadores plasmáticos são as citocinas e o sistema complemento, processo de coagulação e o processo fibrinolítico. Estes mediadores estão na forma precursora e necessitam ser ativados para promover os seus efeitos biológicos. Fazem parte dos mediadores celulares as aminas vasoativas (histamina, serotonina), os metabólitos derivados do ácido araquidônico (eicosanóides), as enzimas lisossomais, as metaloproteinases, os radicais livres derivados do oxigênio e o PAF. Estes mediadores podem ser pré-formados ou sintetizados nas células ativadas, em resposta a um estímulo (BARNES, ADCOCK, 1993).

Atualmente existem vários produtos, naturais e sintéticos, que são utilizados para o tratamento dos mais diversos processos inflamatórios. Entretanto, até o momento, não foi identificado o anti-inflamatório ideal, quer seja pela limitação de sua eficácia, quer seja pela amplitude dos seus efeitos adversos. Neste aspecto, é importante salientar que, muitos dos anti-inflamatórios, de uso oral, disponíveis atualmente são capazes de induzir lesões gástricas por inibirem a síntese de prostaglandinas (PGs), o que representa uma importante limitação ao uso do produto. Assim, a procura por substâncias que apresentem potente atividade anti-inflamatória e efeitos adversos limitados continua sendo bastante estimulada na comunidade científica (SANTOS NETO, 2009).

Dentre os produtos naturais, os polissacarídeos atraem a atenção da comunidade científica, uma vez que sua complexa estrutura pode modular diversas ações fisiológicas e patológicas, como a inflamação (KANG et al., 2011). Desde a primeira metade do século 21, ensaios com polissacarídeos são relatados, com resultados promissores na diminuição de edema e da adesão de macrófagos (POPOV et al., 2005; TONG et al., 2011). Polissacarídeos como as pectinas, glucanas, galactomanoglucanas e glucomananas foram alvos de investigação em experimentos *in vivo* e *in vitro*, demonstrando a capacidade de diminuir edema, inibir a permeabilidade capilar

e estimulação da capacidade fagocítica (da SILVA, PARENTE, 2003; BARRETO, PARENTE, 2006; da SILVA, PARENTE, 2010).

Os trabalhos descritos desde a década de 80 do século 20 para a *Aloe barbadensis*, utilizaram o EA nos ensaios de atividade anti-inflamatória em diversos modelos como o de edema de pata, edema de orelha e modelos flogogênicos (DAVIS et al., 1986; DAVIS et al., 1989; VÁZQUEZ et al., 1996). Os resultados descritos apontaram para a atuação sinérgica dos polissacarídeos e antraquinonas, presentes no EA, como responsáveis pela ação anti-inflamatória (GRINDLAY, REYNOLDS, 1986; DAVIS et al., 1989; CAPASSO et al., 1998).

Sendo assim, o papel dos polissacarídeos de *Aloe* não está totalmente esclarecido, carecendo de maiores estudos. Os aspectos relacionados a ação antioxidante e a modulação de células do sistema imune serão explorados no presente trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e processamento da matéria prima vegetal

As folhas de *Aloe barbadensis* Miller foram fornecidas pela empresa Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltda[®] da cidade de Paulo Lopes – SC. As plantas utilizadas nos experimentos foram cultivadas em sistema orgânico de cultivo, em solo com baixa concentração de matéria orgânica e sem suplementação nutricional artificial, o que cria uma situação diferenciada para esta cultura.

As folhas foram coletadas de plantas com a idade de aproximadamente 7 anos. Após a coleta, as folhas foram lavadas, e submetidas à remoção manual da epiderme e parênquima clorofiliano (popularmente denominado de casca) para obtenção da polpa das folhas (parênquima de reserva).

4.2. Processo extrativo dos polissacarídeos

A polpa obtida das folhas, conforme descrito no item 4.1, foi liofilizada e posteriormente triturada em liquidificador até que o tecido fosse totalmente desagregado. A seguir, o material foi reidratado com água purificada suficiente para que resultasse em uma massa de aspecto gelatinoso. O material foi centrifugado (centrífuga Hitachi Hima ICR 21E4, Japão), a 9800 x g por 30 min (Figura 11). O precipitado – fibras formadoras do tecido parenquimático – foi descartado e o sobrenadante foi denominado de extrato aquoso de *Aloe* (EA). Ao EA, foram adicionados 6 volumes de etanol 92° GL gelado e mantido a 4°C por cerca de 12 h. Posteriormente, foi filtrado em papel e o retido obtido, transferido para uma cápsula de porcelana e seco em estufa a 50°C, sendo sequencialmente moído em moinho para minerais (Departamento de Geologia – UFPR). O material obtido foi denominado fração polissacarídica bruta (FPB).

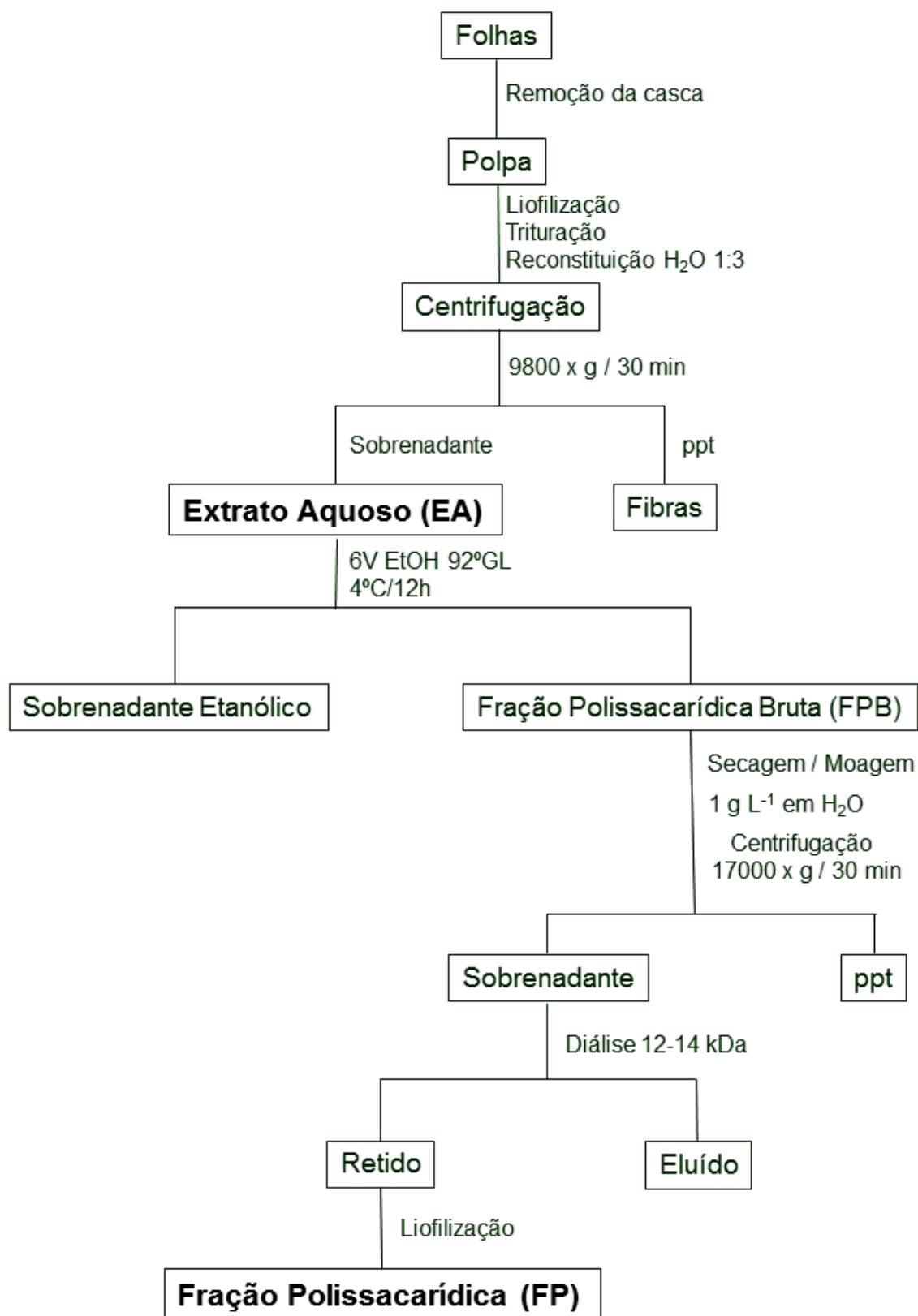


Figura 11 – Processo de obtenção do EA e da FP.

Fonte: O autor

A FPB foi solubilizada em água (1 g L^{-1}) e sequencialmente submetida à centrifugação a $17000 \times g$ por 30 min a 4°C sendo obtidas duas frações. O material precipitado, que foi liofilizado e armazenado, não fazendo parte do estudo aqui realizado, e o sobrenadante, que foi coletado, dialisado em membrana de acetato de celulose (limite de exclusão de 12-14 kDa) e liofilizado, originando a fração polissacarídica (FP).

4.3. Fracionamento dos polissacarídeos por diálise e microfiltração

Para a separação dos polissacarídeos presentes na FP, esta foi submetida inicialmente à microfiltração em membrana de acetato de celulose com poro de $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius®), utilizando para tanto, um sistema de filtração (modelo 16249, Sartorius®) acoplado a um cilindro de nitrogênio gasoso, seguindo a metodologia descrita por Carbonero e colaboradores (2006) (Figura 12).

A fração retida na membrana filtrante foi ainda submetida a diálise fechada sequencial contra água destilada em membrana com limite de exclusão de 1000 Da. A fração que passou pela membrana de micro-filtração foi igualmente submetida a diálise fechada em membrana de 1000 e 500 Da.

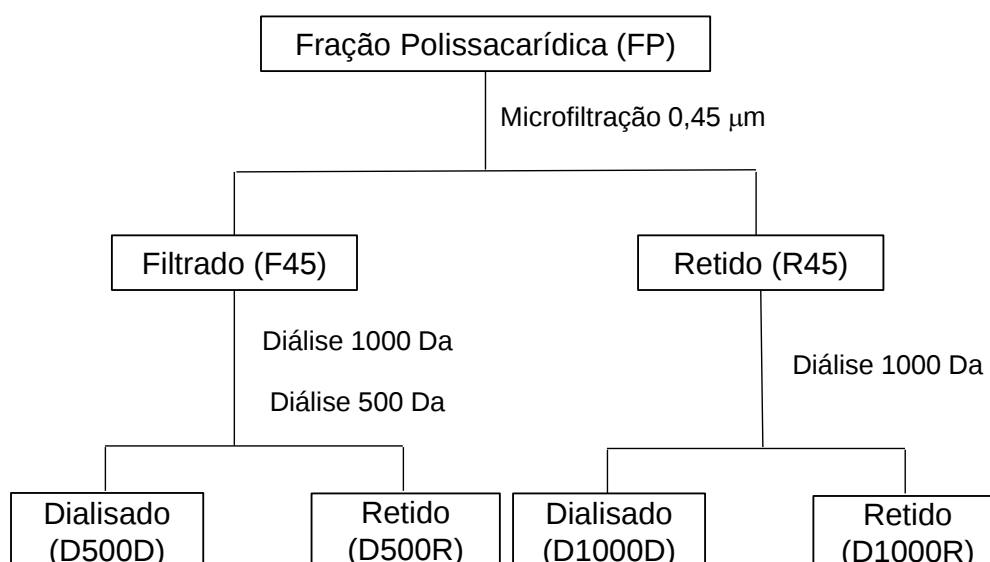


Figura 12 – Fracionamento da Fração Polissacarídica (FP) por microfiltração e diálise.

Fonte: O autor

4.4. Métodos analíticos gerais

4.4.1. A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método de Dubois e colaboradores (1956), com sensibilidade entre 10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando manose como padrão. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm.

4.4.2. O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando uma curva-padrão de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA). As leituras foram realizadas a 595 nm.

4.4.3. As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), utilizando como padrão o ácido glucurônico e realizando a leitura no comprimento de onda de 525 nm.

4.4.4. As dosagens de grupamentos acetil foram realizadas pelo método de Hestrin (1949), utilizando glucose pentacetato como padrão para a construção da curva e realizando a leitura a 540 nm.

4.5. Hidrólise

A hidrólise dos materiais foi realizada segundo Chow e colaboradores (2005) com modificações. Os polissacarídeos (aproximadamente 1 mg) foram submetidos à hidrólise ácida total com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M, por 3 h a 120 °C. Após hidrólise, o ácido foi completamente removido por evaporação. As amostras hidrolisadas foram ressuspensas em água e reduzidas pela adição de borohidreto de sódio (NaBH_4) e incubação por 24 h. A solução obtida foi tratada com ácido acético até pH 4,5 e evaporada até secar sob fluxo de nitrogênio. O excesso de borato foi removido por co-distilação com metanol até que a solução apresentou-se límpida (4-5 vezes), quando então procedeu-se a acetilação, com 0,5 mL de anidrido acético a 100°C, por 1 h. Posteriormente foi executada a partição com clorofórmio a fim de que os compostos acetilados solubilizassem no solvente e a lavagem com bicarbonato de sódio aquoso e água destilada (WOLFROM; THOMPSON,

1963a, 1963b), até que a fração aquosa atingisse o pH 6,5-7,0. Os monossacarídeos na forma de acetatos de alditóis foram extraídos da fase clorofórmica e então analisados por cromatografia líquido gasosa (CLG).

Para a hidrólise dos metilados, o tubo contendo os polissacarídeos parcialmente metilados (1 mg) foi acrescido de ácido fórmico 45% e mantido em estufa a 50 °C por 14 h. Após, o tubo foi retirado e deixado esfriar à temperatura de 25 °C e o ácido foi evaporado através de fluxo de nitrogênio. Os passos seguintes seguiram o anteriormente mencionados.

4.6. Análise de metilação

Para a análise das posições dos grupos acetil, foi realizado o processo de metilação em meio neutro proposto por Prehn (1980). A FP (5 mg) foi seca em pistola com pentóxido de fósforo por 24 h. Após secagem, a FP foi rapidamente transferida a um tubo com tampa rosqueável seco em estufa e adicionado tributilfosfato (2 mL). O conjunto foi mantido em banho-maria a 50°C até dissolução da amostra, quando então foi adicionado 2,6-di-terc-butilpiridina (150 µL). Após cerca de 5 min, adicionou-se o agente metilante: metil-trifluorometano sulfonato (100 µL). A reação permaneceu por 2 h nas condições citadas e ao final do tempo, retirou-se o tubo do banho e deixou-se arrefecer. A seguir, ao tubo foram adicionados 2 mL de clorofórmio e 2 mL de água e vigorosamente agitado. A fase aquosa foi descartada e 100 µL da fase orgânica foi transferido para um tubo de hidrólise, sendo o material volátil evaporado sob fluxo de nitrogênio antes de iniciar o processo de hidrólise, redução e acetilação, conforme anteriormente descrito.

4.7. Cromatografia líquido-gasosa (CLG) e cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas (CLG-EM)

Para as análises dos acetatos de alditóis obtidos nos itens 4.4.5, foi utilizado um cromatógrafo gasoso modelo trace GC ultra (Thermo), equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. As injeções foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50 °C e seguida de

aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40°C por min, até 230°C, mantendo-se constante. O gás hélio foi usado como gás de arraste. Os acetatos de alditóis foram identificados pelos tempos de retenção em comparação com os padrões.

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas dos derivados obtidos no item 4.5, foram realizadas em um cromatógrafo a gás “VARIAN”, modelo Saturn 2000R, 3800, acoplado a um espectrômetro de massa também da marca VARIAN, modelo 2000R (tipo ion-trap). O cromatógrafo foi equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.; modelo DB-23, marca J & W Scientific). Outra coluna utilizada foi a de sílica fundida revestida com DB-225MS (30 m X 0,25 mm d.i., marca J & W Scientific). As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40 °C por minuto, até 230 °C, mantendo-se constante a partir deste valor. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,0 ml min⁻¹. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, abrangendo fragmentos com relação massa/carga (m/z) variando de 40 a 300. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis parcialmente metilados, sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons comparados com padrões descritos na literatura (JANSSON et al., 1976, SASSAKI et al., 2005).

4.8. Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência acoplada a detector de espalhamento de luz multiângulos e índice de refração (HPSEC/MALLS/RI) – Análise de homogeneidade e massa molar

As análises de homogeneidade e de determinação do valor de massa molar média ponderal (Mw) foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em

diferentes ângulos e um detector de índice de refração diferencial (RI) WATERS modelo 2410. Quatro colunas Ultrahydrogel[®] (WATERS) com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , 5×10^3 g mol⁻¹, foram utilizadas em série. A fase móvel utilizada foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂, 0,1 M) contendo azida sódica (NaN₃ 200 ppm), a um fluxo de 0,6 mL min⁻¹ a 20 °C.

Para a análise de homogeneidade e determinação da massa molar ponderal média (Mw) foram preparadas soluções dos polissacarídeos na concentração de 1 mg mL⁻¹ em solução de NaNO₂ (0,1 M) contendo NaN₃ (200 ppm). As soluções obtidas foram filtradas em membranas de acetato de celulose (MILLIPORE[®]) de 0,22 µm. Para determinação de Mw utilizou-se o valor de dn/dc (variação do índice de refração com relação à concentração) de soluções contendo 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg mL⁻¹ do polissacarídeo, preparadas a partir de uma solução contendo 1,0 mg da amostra em 1 mL de NaNO₂ (0,1 M) e azida de sódio (200 ppm) previamente filtradas em membrana Millipore 0,45 µm. As análises foram realizadas utilizando o RI, com fluxo de 0,1 mL min⁻¹, a 20 °C. Para a análise dos dados obtidos, foi utilizado o programa ASTRA (WYATT TECHNOLOGY).

A determinação de Mw, como descrito acima, foi realizada para as frações que apresentem detecção no MALLS. Para as demais, as análises de HPSEC foram realizadas com equipamento SB 806 HQ Viscotek Dual Detector 270, com colunas de polimetacrilato, acopladas ao refratômetro diferencial da Viscotek modelo VE3580, a um detector de espalhamento de luz laser, modelo 270 Dual Detector (Viscotek), contínuo por baixo ângulo a 7° (LALLS – *Low Angle Laser Light Scattering*) e ângulo de 90° (RALLS - *Right Angle Laser Light Scattering*) com λ 632,8 nm. Como eluente foi utilizado NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ e NaN₃ 200 ppm, o mesmo solvente usado para solubilizar as amostras, com fluxo de 0,4 mL min⁻¹. A calibração foi realizada com padrões de óxido de polietileno (PEO, 22.000 g mol⁻¹) e dextrana (77.000 g mol⁻¹). Análises para determinação de Mw foram determinados no equipamento descrito acima. As variações do índice de refração em função da concentração polimérica foram determinadas usando um refratômetro da Viscotek, modelo VE3580. Todos os dados coletados foram analisados através do software OmniSec.

4.9. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas em espectroscópio da marca BRUKER, modelo Avance III 400, em sonda de diâmetro externo de 5 mm, com as amostras dissolvidas em óxido de deutério (D_2O) a 65 °C ou 70 °C. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises de ^{13}C (30,2 ppm) como para 1H (2,22 ppm).

4.9.1. Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono ^{13}C (RMN - ^{13}C) e de próton (RMN - 1H) unidimensionais (1D)

Os espectros de RMN- ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. Os experimentos de RMN- ^{13}C -DEPT-135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) foram utilizados para assinalar os carbonos CH_2 negativos no espectro, facilitando, deste modo, a determinação dos sinais correspondentes aos carbonos secundários e terciários, auxiliando os assinalamentos de ligantes nos polissacarídeos estudados.

Os espectros de RMN- 1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção completa das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D_2O , congelamento e liofilização (este processo foi repetido por 3 vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao OH, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido. Os espectros foram obtidos em D_2O a 65°C.

4.9.2. Experimentos de RMN bidimensionais (2D)

COSY (*Correlation Spectroscopy*) é uma técnica homonuclear que foi utilizada para correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de ^{13}C ou 1H que estão acoplados um ao outro. Cada unidade monossacarídica

apresenta um padrão de constantes de acoplamento característico, o que permitiu determinar o tipo de açúcar presente na estrutura.

TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) também é uma técnica homonuclear onde as correlações foram dadas por todos os núcleos do sistema e não somente por um par.

HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*) é uma técnica heteronuclear que permite determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados a quais átomos de carbono (^{13}C) através de suas correlações obtidas no espectro, a partir de sinais de ^{13}C conhecidos ou de ^1H já conhecidos.

Para estes experimentos 10 mg da amostra foi dissolvida em D_2O e os espectros foram obtidos a 65°C .

4.10. Estratégia metodológica para a desacetilação da fração polissacarídica (FP)

A desacetilação da FP foi feita pelo método modificado descrito por Chow e colaboradores (2005), com modificações. FP (6 mg mL^{-1}) foi mantida sob agitação constante e temperatura de 25°C até sua completa dissolução. Após esta etapa, foi acrescentado igual volume de uma solução de NaOH $0,12 \text{ M}$. O meio reacional assim obtido, foi mantido por 1 h sob agitação magnética e após, foi neutralizado pela adição de ácido acético. A solução foi dialisada em membrana de limite de exclusão de 12-14 kDa contra água destilada por 24 h a 25°C e posteriormente liofilizada.

4.11. Estratégia metodológica para a despolimerização de FP

4.11.1. Despolimerização enzimática de FP nativa

A despolimerização enzimática da FP nativa foi realizada segundo a metodologia descrita por Chow e colaboradores (2005), com modificações.

FP (300 mg) foi dissolvida (3 mg mL^{-1}) em tampão acetato 100 mM , pH 4,5, a 45°C . A seguir, 1U ($4 \mu\text{L}$) de endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-mananase (Megazyme[®] – Irlanda) foi adicionada e a solução foi incubada por 24 h a 45°C . A cada hora

uma alíquota foi retirada para análise da cinética da hidrólise através do método do ácido 3-5-dinitrosalicílico – DNS, para açúcares redutores (MILLER, 1959). A reação foi finalizada com aquecimento a 100°C por 10 min. Os oligossacarídeos obtidos foram filtrados em membrana 0,45 µm e liofilizados. Da mesma forma, foi utilizada a enzima endo-1→3(4)-β-D-glucanase (Viscozyme L[®] – 100 FBG/g, Novozymes[®], Dinamarca) não purificada, de *Aspergillus aculeatus* nas mesmas condições de reação descritas anteriormente. A reação enzimática foi avaliada como o descrito para a endo-(1→4)-β-D-mananase.

4.11.2. Despolimerização enzimática de FP desacetilada

A despolimerização enzimática da FP desacetilada foi preparada da forma como descrita no item 4.10.1, até a etapa de neutralização com ácido acético, quando então a solução foi tratada diretamente com as enzimas, conforme descrito anteriormente.

4.12. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para acompanhamento da reação de despolimerização e verificação dos produtos de hidrólise, foi utilizada a cromatografia em camada delgada. Para tanto, placas de sílica gel de 10 x 10 cm (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA) foram secas em estufa e os produtos da despolimerização parcial aplicado com padrões. A fase móvel utilizada foi acetato de etila:n-propanol:ácido acético:água na proporção de 4:2:2:1 (v/v/v/v) e o revelador empregado foi orcinol sulfúrico (STAHL, 1965).

4.13. Cromatografia de gel permeação em BioGel P2

Para separação dos oligossacarídeos obtidos pelas hidrólises enzimáticas descritas no item 4.11, foi empregada uma coluna de cromatografia de dimensões 160 de comprimento e 3 cm de diâmetro interno, preenchida com 800 mL de BioGel P2[®] (Biorad).

A coluna foi calibrada com Blue Dextran (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA) e para todas as separações foi utilizada como fase móvel água destilada (1 mL min^{-1}). Para a coleta das frações, empregou-se um coletor automático de frações programado para coleta a cada 5 min. O perfil cromatográfico foi construído a partir da análise de uma alíquota ($50 \text{ }\mu\text{L}$) de cada amostra mais $450 \text{ }\mu\text{L}$ de água, realizando-se a reação de Dubois e colaboradores (1956) e plotando o gráfico da absorbância versus volume eluído.

A cromatografia BioGel P2 também foi utilizada para desalificação dos produtos de hidrólise, os quais continham acetato de sódio utilizado no tampão. Para isso, foi empregada uma coluna de $40 \times 1,5 \text{ cm}$ de diâmetro interno, preenchida com BioGel P2[®], eluída com água. A corrida cromatográfica foi monitorada através da reação fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

4.14. Análise em ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*)

As diferentes frações obtidas da cromatografia em gel permeação foram analisadas em espectrômetro de massas tipo electrospray utilizando o equipamento Micromass Quattro LC-MS, tipo duplo quadrupolo (Waters) e processados pelo programa Maslynx 3.2. Para a realização das análises, as amostras foram dissolvidas em metanol:água (1:1, v/v) e introduzidas no espectrômetro através de uma seringa acoplada a um injetor (KD Scientific Inc.). Como gás de nebulização foi utilizado nitrogênio à pressão de 30 psi. Os espectros foram adquiridos em modo positivo de ionização à temperatura do capilar de 275°C , a 1 V, voltagem do spray de 95 eV. A amostra foi aplicada a um fluxo de $8 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ e foram varridas 180 a 3000 de m/z.

4.15. Análise em MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry*)

As análises por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF foram realizadas em espectrômetro Bruker autoflex II. Em cada poço de uma placa para análise MALDI-TOF foram depositados $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra dissolvida em água purificada pelo sistema Milli-Q e $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de matriz 2,5-DHB

(ácido 2,5-dihidróxibenzóico – 10 mg mL⁻¹ em metanol) (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA). Após co-cristalização da amostra com a matriz, foram realizadas análises no modo linear positivo. O espectro resultante foi acumulado após 150 tiros de laser com duração de 5 ns. As condições de aquisição foram: voltagem de aceleração de 20 kV com um intervalo de 250 ns entre o pulso de laser e a aplicação da voltagem. O intervalo de massas analisado foi de 100 a 2000 m/z.

4.16. Análises Reológicas

Para a realização das análises reológicas foram selecionadas as amostras do EA e da FP. As amostras foram solubilizadas em água ultra-pura em concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 g L⁻¹, com agitação por 12 h a 25 °C, seguida de repouso por 2 h previamente às análises.

As análises reológicas foram realizadas em reômetro HAAKE, modelo RS-1 e um sensor placa-placa PP35-Ti (35 mm de diâmetro), acoplado a um banho termostatizado (Modelo TC-500 - Brookfield®)

Todas as análises foram realizadas a 25 °C. As curvas de viscosidade das amostras foram obtidas a taxa de cisalhamento contínua em modo CR (taxa de cisalhamento controlada).

A fim de determinar a tensão correspondente à região viscoelástica linear, foi realizado uma varredura de tensão que variou de 0-100 Pa, a uma frequência constante de 1 Hz.

Nos ensaios de fluência e recuperação foi adotado um tempo de 300 s para a fase de fluência e 300 s para a de recuperação a 25 °C, em uma tensão de 3 Pa.

Os espectros mecânicos (dinâmicos oscilatórios) obtidos, foram caracterizados por valores de G', G'' (Pa) em função da frequência (f) na faixa de 0,01-10 Hz. Os softwares RheoWin3 Data Manager e OriginPro 8.0 foram empregados para analisar e processar os resultados reológicos respectivamente, sendo que todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.17. Ensaios *in vitro* para determinação da atividade antioxidante

Nos ensaios *in vitro* para a determinação das atividades antioxidantes, foram testadas as amostras EA (Extrato Aquoso), FP (Fração Polissacarídica), HP (Polissacarídeo de Média Massa), MNR2 (Fração Polissacarídica Nativa Hidrolisada com Mananase) e SP (Pequeno Polissacarídeo), nas concentrações de 100, 200, 400 e 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata e os resultados foram expressos como valores médios em percentagem $\pm$ EPM (erro padrão da média) das porcentagens. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa Statística 6.0 utilizando teste de Tukey.

4.17.1. Ensaio pela determinação da atividade redutora do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH)

A atividade redutora do radical DPPH foi determinada através do método descrito por Blois (1958), adaptado por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995). Neste método, a redução do radical sintético DPPH, observado pela sua descoloração, é avaliada pela medida da extinção de sua absorção máxima em 517 nm. Para tal, uma solução metanólica de DPPH (1 mM, 100 μL) foi incubada durante 30 min, à temperatura ambiente, com 300 μL de concentrações das amostras ou antioxidantes de referência butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT) (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Após esse período, 200 μL de cada solução foram transferidas para uma placa de 96 poços e realizada a leitura espectrofotométrica em 517 nm, tendo como controle do método 300 μL de metanol em lugar das amostras. Os ensaios foram realizados em triplicata e o percentual sequestrador do radical DPPH foi calculado em termos de percentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme fórmula abaixo:

$$AA (\%) = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

4.17.2. Ensaio da determinação do poder redutor

O poder redutor das amostras foi determinado pelo método descrito por Oyaizu (1986). Em microtubos tipo eppendorf foram adicionados 250 μL das amostras, solubilizadas em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6 (65,5 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M + 37,5 mL de Na_2HPO_4 0,2 M), nas concentrações descritas e em triplicata. A seguir, adicionou-se igual volume de tampão fosfato de sódio e 250 μL de solução de ferrocianeto de potássio a 1% (m/v). Os tubos foram então incubados em banho-maria a 50°C por 20 min. Passado o tempo, os tubos foram retirados e deixados resfriar a 25 °C. Seguidamente, foram adicionados 250 μL de ácido tricloroacético a 10% (m/v) e centrifugados a 650 rpm por 10 min. Após esta etapa, 200 μL do sobrenadante foram colocados em poços de uma placa de 96 poços e a seguir, 50 μL de solução de cloreto férrico 0,1% (m/v) foram adicionados em cada poço.

Concomitantemente, foram preparadas amostras referentes ao branco do método (água destilada em lugar das amostras) e dos antioxidantes de referência (BHA e BHT, na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tratados da mesma forma que as amostras. A absorbância das amostras foi determinada a 700 nm, em espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) sendo que maiores valores de absorbância indicam maior poder redutor.

4.17.3. Ensaio da determinação da capacidade sequestradora do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$)

A avaliação da capacidade sequestradora do radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ foi obtida utilizando o sistema fenazina-metassulfato-NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) para geração deste radical (NISHIKIMI; RAO; YAGI, 1972). Em cubetas de quartzo de volume 1,5 mL, foram adicionados 900 μL das amostras, dissolvidas em tampão tris-HCl 10 mM, pH 8,8, 20 μL de solução de azul de nitrotetrazólio (NBT – 72 μM), 20 μL de solução de metassulfato de fenazina (30 μM), 60 μL de NADH (468 μM). Como controle do método foram

utilizados 900 μL de H_2O e como antioxidantes de referência, o ácido ascórbico e ácido gálico ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 340 nm. As percentagens foram calculadas de acordo com a fórmula:

$$\text{Captura de ânions superóxido (\%)} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) / \text{Abs}_{\text{controle}} \times 100$$

4.17.4. Atividade de captação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$)

Em microtubos tipo *ependorf* foram adicionados 200 μL das amostras, nas concentrações descritas. A seguir, acrescentou-se 200 μL de H_2O_2 (8,8 mM), 200 μL de FeSO_4 (6 mM), agitou-se vigorosamente e deixou-se incubar por 10 min. Passado esse período, 200 μL de uma solução de ácido salicílico (6 mM), foram adicionados a cada tubo. A seguir, 200 μL da solução dos tubos foram transferidas para uma placa de 96 poços e realizada a leitura em espectrofotômetro a 510 nm (SMIRNOFF, CUMBES, 1989). Conjuntamente, foram preparadas amostras referentes ao branco do método que consistiu de água destilada em lugar das amostras e do antioxidante de referência (BHA e BHT $200 \mu\text{g mL}^{-1}$), preparados de igual maneira das amostras.

As percentagens foram calculadas de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Captação de } \cdot\text{OH (\%)} = (\text{Abs.}_{\text{amostra}} - \text{Abs.}_{\text{branco}}) / \text{Abs.}_{\text{controle}} \times 100$$

4.17.5. Atividade de captação do radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)

O radical $\text{NO}\cdot$ pode ser gerado pela solubilização do nitroprussiato de sódio em meio aquoso (MARCOCCI et al., 1994). Em microtubos tipo *ependorf*, foram adicionados 250 μL de nitroprussiato de sódio 200 mM, em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 (19,0 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M + 81,0 mL de Na_2HPO_4 0,2 M) e 250 μL das amostras nas diferentes concentrações, igualmente dissolvidas no mesmo tampão. Os tubos foram incubados a 25°C por 3 h. Passado esse tempo, 100 μL de cada tubo foram transferidos para poços de uma placa de 96 cavidades e a cada poço foi adicionado 100 μL do

reagente de Griess (solução de sulfanilamida a 1% (m/v) e solução de naftilenodiamida a 0,1% (m/v) ambas da Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA, na proporção de 1:1, ambas em ácido fosfórico 2.5% (v/v)), seguida de leitura a 546 nm em espectrofotômetro (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA). As amostras foram realizadas em triplicata e como branco do método, utilizou-se água ultra-pura e como antioxidantes de referência foram utilizados o ácido ascórbico e ácido gálico, ambos na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As porcentagens de captação de radicais $\text{NO}^{\bullet}$ foram calculadas de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Captação de NO}^{\bullet} (\%) = [(\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{branco}}] \times 100.$$

4.17.6. Atividade de quelação de Fe^{2+}

O efeito quelante das amostras foi avaliado segundo a metodologia descrita por Stookey (1970), modificada por Decker e Welch (1990). Tubos de vidro foram deixados por 12 h em solução 0,1 M de HCl para eliminação de íons ferro presente. Seguidamente, os tubos foram lavados sequencialmente com água destilada, água deionizada e secos em estufa. Aos tubos, foram adicionados 1 mL das amostras nas concentrações anteriormente descritas, 3,7 mL de água deionizada e 100 μL de solução 2 mM de FeCl_2 . Os tubos foram agitados e deixados reagir por 10 min. Concomitantemente, foram preparados o branco do método, composto por 1mL de água deionizada e do padrão quelante (EDTA, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Passado o tempo, foram adicionados 200 μL da solução de Ferrozine[®] (sal hidratado de *p,p'*-ácido dissulfônico-3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-monossódico), com posterior agitação vigorosa. Após 10 min a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro (marca BEL modelo SF200DM, Monza, Itália) a 562 nm. As porcentagens de quelação do íon Fe^{2+} foram calculadas de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{branco}})] \times 100$$

4.18. Ensaios de imunoestimulação de macrófagos peritoneais de camundongos

4.18.1. Procedimentos gerais

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Experimentação e Ética Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, segundo protocolo 489 do processo 23075.041511/2010-93.

Os procedimentos gerais para preparo de soluções e meio de cultura do cultivo animal estão descritos abaixo:

- a) procedimento de cultivo celular: todas as operações envolvendo o cultivo celular foram desenvolvidas em capela de fluxo laminar do tipo vertical II A1 equipada com filtro HEPA (“high efficiency particulate air”) da Filterflux® (Piracicaba, SP - Brasil);
- b) soluções: todas as soluções utilizadas para o cultivo celular foram preparadas com água ultra pura, obtida em aparelho Milli-Q da Millipore; solução salina tamponada (PBS): a solução estoque de salina tamponada composta por 40,5 mmol.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 680 mmol L⁻¹ de NaCl e 7,3 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄, pH 7,4, foi esterilizada a 120 °C e 1 atm, por 30 min e armazenada a 4 °C. No momento do uso foi diluída cinco vezes com água MilliQ igualmente estéril;
- c) A esterilização das soluções termolábeis foi realizada por ultrafiltração positiva, sob pressão, utilizando-se membranas de acetato de celulose, com poros de 0,22 µm da Techno Plastic products AG® (TPP) (Trasadingen – Suíça);
- d) meio de cultura: para a manutenção celular, foi utilizado o meio essencial mínimo de Eagle estéril (MEM) (Cultilab, Campinas-SP, Brasil) (PAUL, 1973) mantido a 4°C. Para o crescimento celular, o meio de Eagle foi enriquecido com soro fetal bovino estéril 5% (v/v) da Laborclin (Curitiba, PR - Brasil).

4.18.2. Preparo das soluções-teste utilizadas nos experimentos com culturas de macrófagos

As amostras (10 mg mL^{-1}) utilizadas nos experimentos foram FP, HP, MNR2 e SP. A amostra HP, MNR2 e SP foram solubilizadas em PBS contendo $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de polimixina B durante 4 h sob agitação a 37°C (CUNHA et al., 1993). Essas soluções foram esterilizadas por ultrafiltração positiva, sob pressão, utilizando-se membranas de acetato de celulose, com poros de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ da Techno Plastic products AG[®] (TPP) (Trasadingen – Suíça). A amostra FP (20 mg mL^{-1}) foi igualmente diluída em PBS e esterilizado por autoclavagem por 15 min a 121°C e 1 atm de pressão. Após a autoclavagem, a solução de FP foi levada à câmara de fluxo e a ela adicionada solução estéril de polimixina B ($50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS), até atingir a concentração de 10 mg mL^{-1} e mantida sob agitação por 2 h a 37°C , até completa solubilização. Em seguida, foi realizada a diluição das amostras em meio MEM estéril, originando as soluções-teste utilizadas nos tratamentos das culturas de macrófagos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.18.3. Obtenção de macrófagos

O modelo animal utilizado para obtenção das células foi camundongos SWISS (*Mus musculus*) fêmeas, com cerca de 60 dias de vida, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas, da UFPR. Os animais foram mantidos em ambiente controlado com fotoperíodo ciclo claro-escuro 12/12, temperatura entre 21 a 25°C e dieta composta por ração Purina e água “*ad libitum*”.

Após a eutanásia dos animais, foi feita a assepsia da região abdominal com álcool etílico 70% (v/v) e exposição da membrana peritoneal. Utilizando seringas e agulhas estéreis, 10 mL de PBS pH 7,4, a 4°C foram inoculados na cavidade peritoneal. Após massagem vigorosa, as células do exsudato peritoneal foram aspiradas com seringa, transferidas para tubos plásticos estéreis e centrifugadas por 2500 rpm por 15 min a 4°C , em centrífuga refrigerada (MPW Med Instruments, modelo MPW-350R – Warsaw, Polônia). As células sedimentadas foram lavadas com 10 mL de solução de hemólise aquosa [hidroximetil aminometano (TRIS) $0,017 \text{ M}$; cloreto de amônio (NH_4Cl) $0,144 \text{ M}$; pH 7,4] para eliminação das possíveis hemácias presentes. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em Meio Eagle (MEM) estéril. A

contagem celular foi feita em câmara de Neubauer, utilizando microscópio invertido (marca Bel Engineering, modelo INV 100, Monza, Itália) e a avaliação da viabilidade celular foi realizada utilizando o método do azul de Tripan (PHILLIPS, 1973).

A suspensão celular contendo os macrófagos (na concentração final de 5×10^5 cél por poço ou 1×10^6 cél por poço) foi aliquoteada em placas de cultura estéreis (Techno Plastic products AG® - TPP- Trasadingen - Suíça), as quais foram incubadas, para aderência das células, por 1 h, a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ (incubadora Thermo Scientific, San Jose, EUA). A monocamada de células aderentes foi lavada duas vezes com PBS estéril, pH 7,4 a 37°C, para retirada de células suspensas, adicionou-se meio de cultura suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino juntamente com as soluções-teste conforme a metodologia descrita para cada tipo de experimento.

4.18.4. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT

Para determinação da viabilidade celular utilizou-se o método descrito por Reilly e colaboradores (1998), do MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). As células metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em dimetil sulfóxido (DMSO) com uma coloração roxa característica.

Nesta avaliação os macrófagos peritoneais já aderidos foram lavados duas vezes com PBS estéril, pH 7,4 e a cada poço foi adicionado meio MEM contendo as amostras descritas, nas concentrações de 2,5, 10, 40, 160 e 640 µg mL⁻¹. Além das soluções-teste, em cada experimento foram realizados os tratamentos controle, no qual as células foram cultivadas somente em meio de cultura por 24 e 48 h.

Em seguida, removeu-se o meio e adicionou-se 180 µL de meio contendo 20 µL de solução de MTT (previamente preparado em PBS na concentração de 5 mg mL⁻¹), obtendo uma concentração final em MTT de 500 µg mL⁻¹. As placas foram incubadas por 3 h, a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5%. Após, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS e finalmente os cristais de formazan, que se formaram nas células viáveis, foram

dissolvidos em 200 μL de DMSO. A absorbância foi medida a 550 nm, em espectrofotômetro (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA), utilizando DMSO como branco.

4.18.5. Dosagem de óxido nítrico produzido por cultura de macrófagos peritoneais

Como o óxido nítrico possui um tempo de meia vida muito curto a determinação da produção deste radical por macrófagos é mensurado pela formação do nitrito (NO_2^-), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito foi realizada pelo método de Griess no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto (GREEN, 1982). Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser quantificado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm (GREEN et al., 1982; SUN et al., 2003).

Para a avaliação da produção de óxido nítrico os macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram plaqueados na densidade de 5×10^5 cél por poço, em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 48 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 , na ausência (grupo controle negativo) ou na presença das amostras descritas. Como controle positivo da ativação da produção de óxido nítrico foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA) na concentração de 50 ng mL^{-1} .

Após o tempo de incubação, 100 μL do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e adicionou-se 100 μL do reagente de Griess. Após incubação por 10 min a absorbância foi medida a 550 nm, em espectrofotômetro marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA, utilizando como branco o meio MEM mais o reativo de Griess. As concentrações de nitrito foram determinadas utilizando uma curva padrão de NaNO_2 em concentrações de 10 μM a 100 μM . Os resultados foram expressos como quantidade de nitrito produzido em $\mu\text{M}/5 \times 10^5$ células.

4.18.6. Dosagem das citocinas produzidas por cultura de macrófagos peritoneais

Numa primeira etapa, 1×10^6 macrófagos por poço (placa de 24 poços) foram incubadas durante 24 h, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, na ausência (grupo controle negativo) ou na presença de 1 mL das amostras anteriormente descritas, no item 4.18.2, nas concentrações de 10, 40, 160 µg mL⁻¹ ou de LPS (50 ηg mL⁻¹ – grupo controle positivo). Em seguida, cada sobrenadante foi centrifugado individualmente (2000 rpm, por 5 min), dividido em 4 alíquotas de 250 µL em microtubos tipo *eppendorf* estéreis identificados, e estocados a -80°C até posterior utilização. Cada microtubo foi destinado à dosagem de uma citocina (IL-1β, IL-6, IL-10 ou TNF-α), pelo menos em duplicata. Assim, com o mesmo sobrenadante, foi possível fazer a dosagem das quatro citocinas.

As dosagens foram determinadas pelo método ELISA, utilizando kits específicos para cada citocina, adquiridos da empresa eBioscience (San Diego-CA, EUA) (Figura 13). Os reagentes utilizados foram preparados de acordo com as especificações do fabricante. Para o ensaio de ELISA, placas de poliestireno (“high binding protein” – catálogo nº 9018, Corning, Lowell, MA, EUA) com 96 cavidades, de fundo chato, foram sensibilizadas durante 18 h a 4°C, com 100 µL poço⁻¹ do anticorpo de captura (1) para cada citocina.

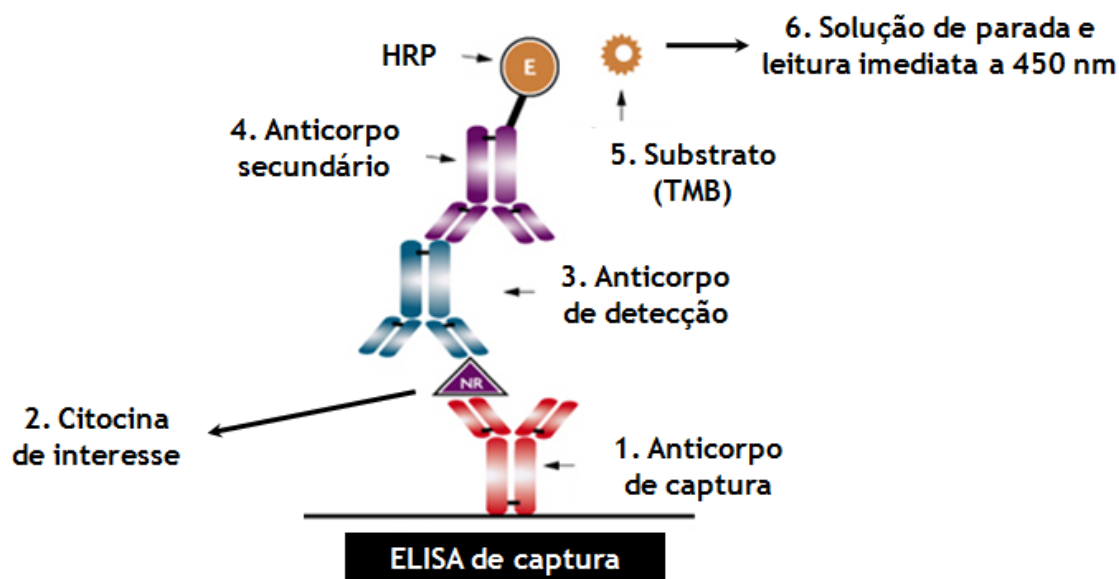


Figura 13 – Ensaio de ELISA de captura.

Fonte: Amaral, 2011

Posteriormente, as placas foram lavadas 5 vezes com 250 μL /poço de tampão de lavagem em lavadora de placas (marca Bio Tek, Winooski, EUA), e em seguida, os poços foram bloqueados com 200 μL poço⁻¹ da solução de diluição. Após 1 h de incubação a temperatura ambiente e 5 ciclos de lavagem das placas, 100 μL poço⁻¹ das amostras e padrões específicos para cada interleucina foram adicionados (2), e as placas novamente incubadas por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes, e o anticorpo de detecção (3) adicionado (100 μL poço⁻¹). Após 1 h de incubação a temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes, 100 μL poço⁻¹ do anticorpo conjugado com a enzima Avidina-HRP (4) foram adicionados e as placas novamente incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Após 7 lavagens, o substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB – 5) foi adicionado (100 μL poço⁻¹) e incubado no escuro, por 15 min a temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com 50 μL de H_2SO_4 1 N (6) e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 450 nm. A curva padrão foi preparada utilizando oito concentrações do padrão específico para cada citocina testada (IL-1 β , IL-6, IL-10 ou TNF- α). Os resultados foram expressos como quantidade de citocina produzidas em $\mu\text{g mL}^{-1}/1 \times 10^6$ células.

4.18.7. Análises morfológicas

Alíquotas de 100 uL de suspensão celular (1×10^6 macrófagos) foram transferidas para placa de 24 poços (nos quais continham lamínulas de vidro). As células foram incubadas durante 24 h, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, na ausência (grupo controle negativo) ou na presença de 1 mL das soluções-teste nas concentrações de 10, 40, 160 e 640 µg mL⁻¹ ou de LPS (50 ηg mL⁻¹) (grupo controle positivo). Após 24h, o sobrenadante foi retirado e o material foi fixado com solução de Bouin, durante 5 min, a temperatura ambiente. Em seguida, os macrófagos aderidos às lamínulas foram corados com Giemsa. A seguir as células foram desidratadas com acetona e diafanizadas com xilol. A montagem das lâminas permanentes foi feita com resina Entelan. As fotomicrografias foram realizadas no Departamento de Botânica da UFPR, utilizando microscópio Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - Japão). A partir das fotomicrografias foi realizada a análise morfológica dos macrófagos.

4.19. Ensaios de edema de pata em camundongo

4.19.1. Animais utilizados no ensaio de edema de pata

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos SWISS (*Mus musculus*) machos (25-35 g), provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas, da UFPR. Os animais foram mantidos em ambiente controlado com fotoperíodo ciclo claro-escuro 12/12, temperatura entre 21 a 25°C e dieta composta por ração Purina® e água “*ad libitum*”. Segundo protocolo 489 do processo 23075.041511/2010-93.

4.19.2. Teste do edema induzido pela carragenina

Seis grupos experimentais (n=5 camundongos/grupo) foram tratados intraplantar com as amostras (FP, HP, MNR2 e SP, na concentração de 20 µg pata⁻¹) ou dexametasona (1 mg kg⁻¹ – controle positivo, Decadronal®). Outros

seis grupos (n=5 camundongos/grupo) foram tratados por via subcutânea (10 mg kg⁻¹). Após 1h animais receberam uma injeção intra-plantar esquerda traseira de 0,1 mL de uma solução de carragenina (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA) 300 µg pata⁻¹. A pata contralateral (controle) recebeu o mesmo volume de solução salina 0,9% (m/v) (WINTER, RISLEY, NUSS, 1962)

Antes dos tratamentos, os animais foram submetidos a uma medida do volume de suas patas traseiras (direita e esquerda). Após as injeções, o volume das patas foi medido utilizando-se um micrômetro digital em intervalos regulares de 30, 60, 120 e 240 min. Os resultados foram expressos como a variação do volume entre as patas esquerdas e direitas e quantificada em mm (KASSUYA et al., 2009). Os resultados foram expressos em percentagem de acordo com a fórmula (ZANG, YE, WANG, 2010):

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{diâmetro da pata controle} - \text{diâmetro da pata amostra})}{\text{diâmetro da pata controle}} \times 100$$

4.20. Análise estatística

Os resultados dos testes de atividade biológica *in vitro* e *in vivo* foram submetidos à análise de variância ANOVA (fator único) e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (média ± EPM) de no mínimo três experimentos em triplicatas. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de p< 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção, rendimentos e análises químicas do Extrato Aquoso de *Aloe* (EA) e da Fração Polissacarídica (FP)

A partir da polpa das folhas de *A. barbadensis* foi isolado o extrato aquoso de *Aloe* (EA) que, após precipitação etanólica e diálise deu origem a fração polissacarídica (FP). A tabela 3 mostra as análises químicas e composição monossacarídica destas frações. Baseado no peso seco da polpa, EA e FP renderam 61,8 e 23,4%, respectivamente e com base no peso fresco da polpa, EA rendeu 0,33%. A polpa de *A. barbadensis* cultivada no Texas (EUA) (WALLER, PELLE, STRICKLAND, 2004) apresentou um rendimento mais baixo (0,11%) em comparação com a fração EA.

Tabela 3 – Composição química e composição monossacarídica das frações EA e FP, obtidas das folhas de *A. barbadensis*.

	Frações	
	EA	FP
Carboidratos (%)	79,8	79,2
Proteínas (%)	5,7	1,3
Acetil (%)	9,2	18,4
Monossacarídeos (mol%)^a		
Rha	3,5	tr. ^b
Ara	2,6	tr.
Man	28,7	94,2
Glc	60,7	3,9
Ácidos urônicos ^c	4,5	1,9

^a analisados em GLC na forma de acetato de alditóis;

^b traços $\leq 1,5\%$;

^c dosagem colorimétrica.

A composição monossacarídica de EA mostrou glucose (60,7 mol%) e manose (28,7 mol%) como principais monossacarídeos neutros enquanto que para FP o teor de glucose diminuiu (60,7 para 3,9 mol%) e o de manose aumentou (28,7 para 94,2 mol%). Assim, a razão molar de manose:glucose para FP corresponde a 24,1:1. Diferentes relações entre Man:Glc são descritas para glucomananas isoladas de *A. barbadensis*, como 22:1 (MANDAL, DAS, 1980b), 19:1 a 4,5:1 GOWDA, NEELISIDDAIAH, ANJANEYALU, 1979) e 15:1 (CHOW et al., 2005).

A percentagem do conteúdo de ácidos urônicos, determinado colorimetricamente, foi de 4,5% e 1,9% para EA e FP, respectivamente. A presença de ácidos urônicos juntamente com arabinose e ramnose é indicativa de quantidade residual de polissacarídeos pécticos na fração EA, como também foi anteriormente observado nos extratos solúveis em água de polpa das folhas de *A. vera* (FEMENIA et al., 1999; NI et al., 2004).

O conteúdo de acetil de EA (9,2%) e FP (18,4%) corresponde a um grau de substituição (DS) de 0,38 e 0,84, respectivamente. O último valor é similar ao relatado para a glucomanana isolada de *A. vera* (0,78) (GOWDA, NEELISIDDAIAH, ANJANEYALU, 1979) e as mananas de *A. saponaria* (0,87) e *A. vanbalenu* (0,81) (GOWDA, 1980). De modo diferente, as glucomananas acetiladas isoladas de *A. plicatilis* (PAULSEN, FAGERHEIM, ØVERBYE, 1978) e *A. arborescens* (WOZNIEWSKI, BLASCHEK, FRANZ, 1990) apresentaram grau de substituição relativamente menor (0,67) e maior (1,3), respectivamente.

As diferenças na composição química de glucomananas (razão Man:Glc e teor de acetil) isoladas de espécies de *Aloe* foram atribuídas a vários fatores, como variações sazonais (FEMENIA et al., 1999; WANG, STRONG, 1993), localizações geográficas (MANDA, DAS, 1980a), processamento de polpa (FEMENIA et al., 2003; RODRIGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2011) e métodos de extração e purificação (ALONSO-SANDE et al., 2009; GOWDA, NEELISIDDAIAH, ANJANEYALU, 1979).

A análise de metilação de FP mostrou a presença de 2,3,6-tri-O-metilmanose (96,0%) e 2,3,6-tri-O-metilglucose (4,0%) o que está de acordo com a presença de um polímero linear constituído por unidades de manopirranose e glucopirranose 4-ligados.

5.2. Análises de homogeneidade e massa molar por HPSEC/MALLS/RI

A figura 14 ilustra os perfis de eluição das frações EA e FP, obtidas por HPSEC/MALLS/RI em função do tempo de eluição.

A análise pelo detector de índice de refração (RI) resulta em um sinal proporcional à *concentração*, ao passo que a resposta do detector de espalhamento de luz (MALLS), depende da concentração, da massa molar e do raio de giro.

A fração EA de *A. barbadensis* exibiu um perfil de eluição heterogêneo pelo detector de RI, como pode ser observado na figura 14a. A fração EA demonstra um perfil polidisperso por MALLS. EA apresenta, como mostrado pelo detector RI, três picos distintos de maior intensidade a 38, 62 e 68 min. O pico de maior intensidade detectado pelo RI, eluído em 68 min, foi atribuído a glucose, de acordo com o perfil de HPSEC deste açúcar (Figura 14c) e com a composição monossacarídica, assim como com os dados de RMN (que serão posteriormente apresentados), que indicam a presença majoritária de glucose livre. A amostra FP apresenta o pico aos 38 min (Figura 14b) coincidente com o observado em EA. Este pico correspondente a um composto com uma massa molar elevada, atribuído as glucomananas isoladas. A massa molar calculada para este polissacarídeo foi de 1230 kDa. O pico em 70 min corresponde ao volume total, V_T , de nosso sistema cromatográfico.

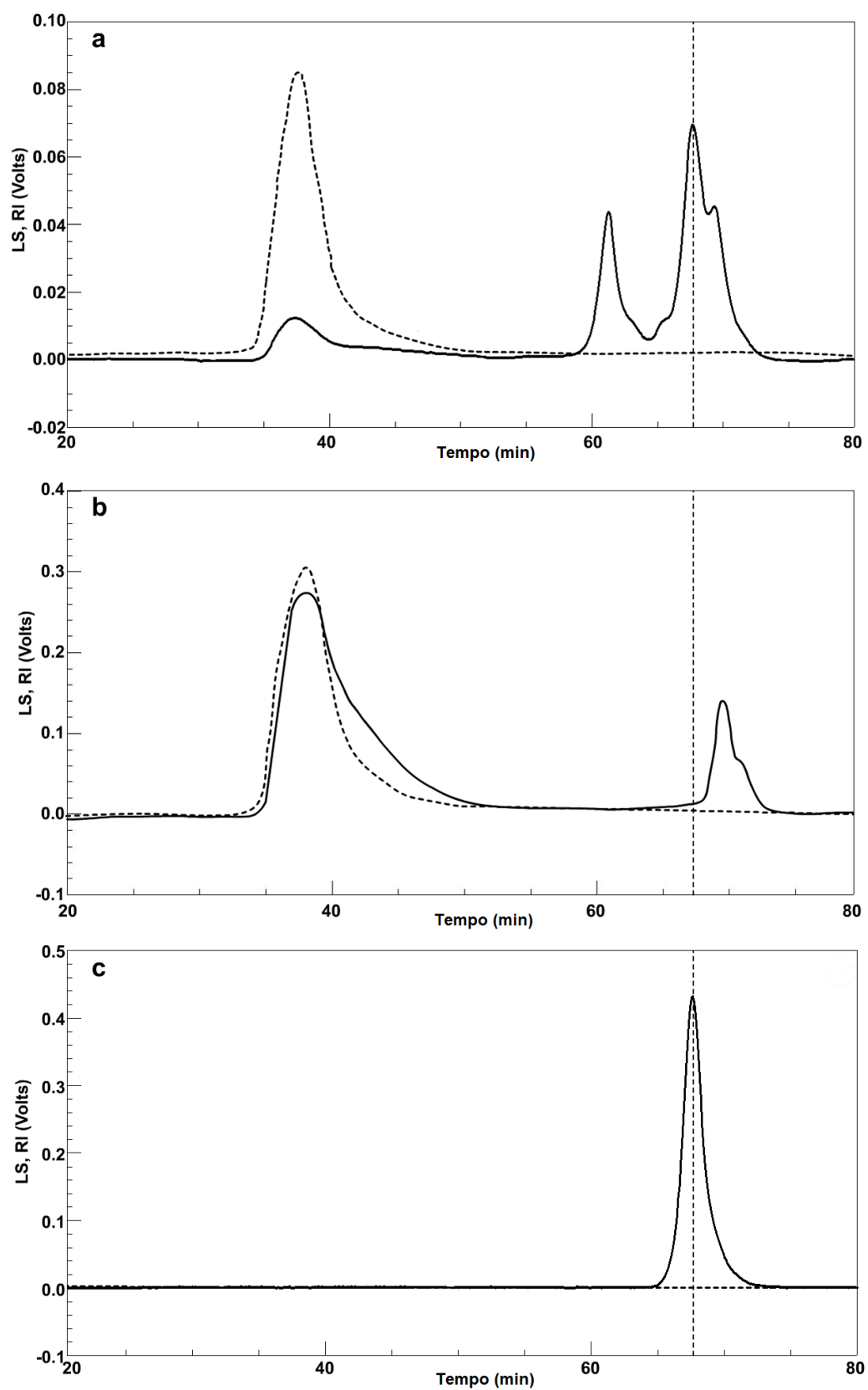


Figura 14 – Perfis de eluição, do EA (a), FP (b) obtidos por HPSEC/MALLS/RI e glucose (c). — RI, - - - MALLS.

Fonte: O autor

5.3. Análises por RMN das amostras EA e FP

O espectro de RMN de ^{13}C de EA (Figura 15a) mostrou dois sinais principais na região anomérica em 92,1 e 96,0 ppm, correspondendo ao C-1 de α e β -anômeros de unidades de glucose redutoras, respectivamente (GORIN, MAZUREK, 1975). Estes resultados mostram a presença de unidades de glucose livre no extrato, o que está de acordo com o elevado teor de açúcares redutores, determinado pelo método colorimétrico de Miller (1959). De modo diferente, no espectro de RMN de ^{13}C de FP (Figura 15b), os sinais anteriormente mencionados não foram observados, o que está de acordo com os resultados das análises de HPSEC/MALLS/RI (Figura 14).

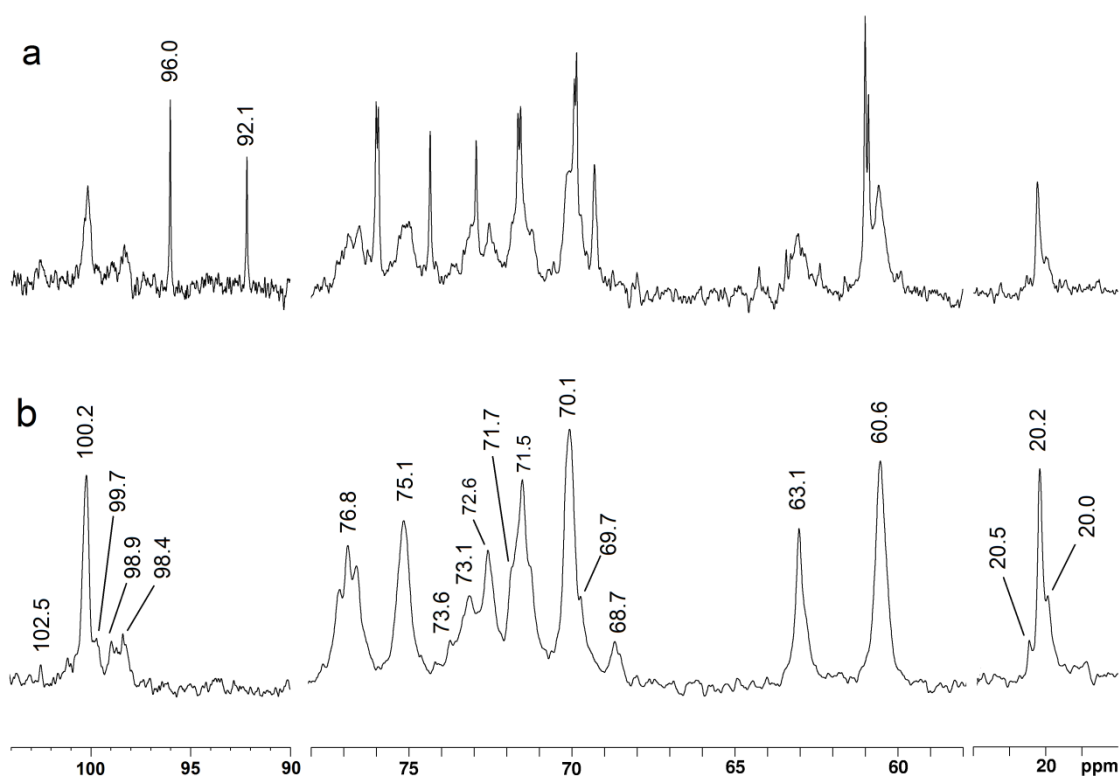


Figura 15 – Espectro de RMN de ^{13}C , relativo à EA (a) e FP (b) obtidos a 70°C em D_2O , usando acetona como padrão interno (30,2 ppm).

Fonte: O autor.

Os espectros de ^1H e ^{13}C de FP foram parcialmente atribuídos utilizando experimentos em 1D (^{13}C DEPT) e 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY e HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$)

e dados da literatura (HANNUKSELA, PENHOAT, 2004; VAN HANZENDOK et al., 1996).

O espectro de RMN de ^{13}C de FP mostra um sinal anomérico intenso em 100,2 ppm, atribuído ao C-1 de unidades β -manopiranosil. No espectro de RMN de ^1H de FP (Figura 16), os sinais anoméricos em 4,75 e 4,71 ppm estão de acordo com a presença de ligação β -glucosídica.

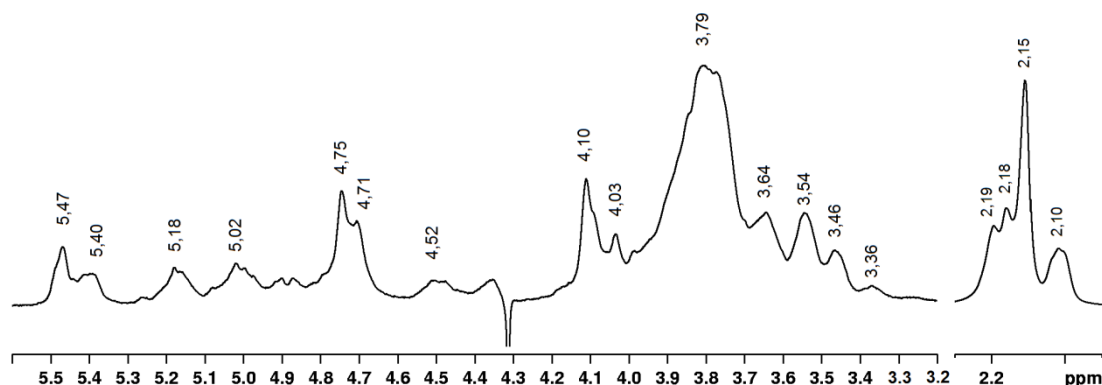


Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H , relativo à FP obtido a 65°C em D_2O , usando acetona como padrão interno (2,22 ppm).

Fonte: O autor.

A partir dos experimentos de HSQC (Figura 17b), as correlações de 100,2/4,75; 4,71; 70,1/4,10; 71,5/3,79; 76,8/3,82; 75,1/3,61; 3,54; 3,46 e 60,6/3,75; 3,88 ppm foram atribuídos a C-1/H-1–C-6/H-6a, b, respectivamente, das unidades β -D-manopiranosil 4-ligadas. Estes assinalamentos estão em concordância com os valores relatados para unidades β -D-manopiranosil 4-ligadas, constituintes de glucomananas isoladas de fibra de linho (VAN HANZENDONK et al., 1996) e para galactoglucomanana obtida da polpa de abeto (HANNUKSELA, PENHOAT, 2004).

O espectro de COSY (Figura 17a) mostrou as correlações H-1/H-2 (4,75/4,10 ppm), H-2/H-3 (4,10/3,79 ppm), H-5/H-6b (3,61/3,88 ppm) e H-6a/H-6b (3,75/3,88 ppm), enquanto que a correlação H-1 a 4,71 ppm mostrou ligação apenas com o seu próton vicinal (4,10 ppm).

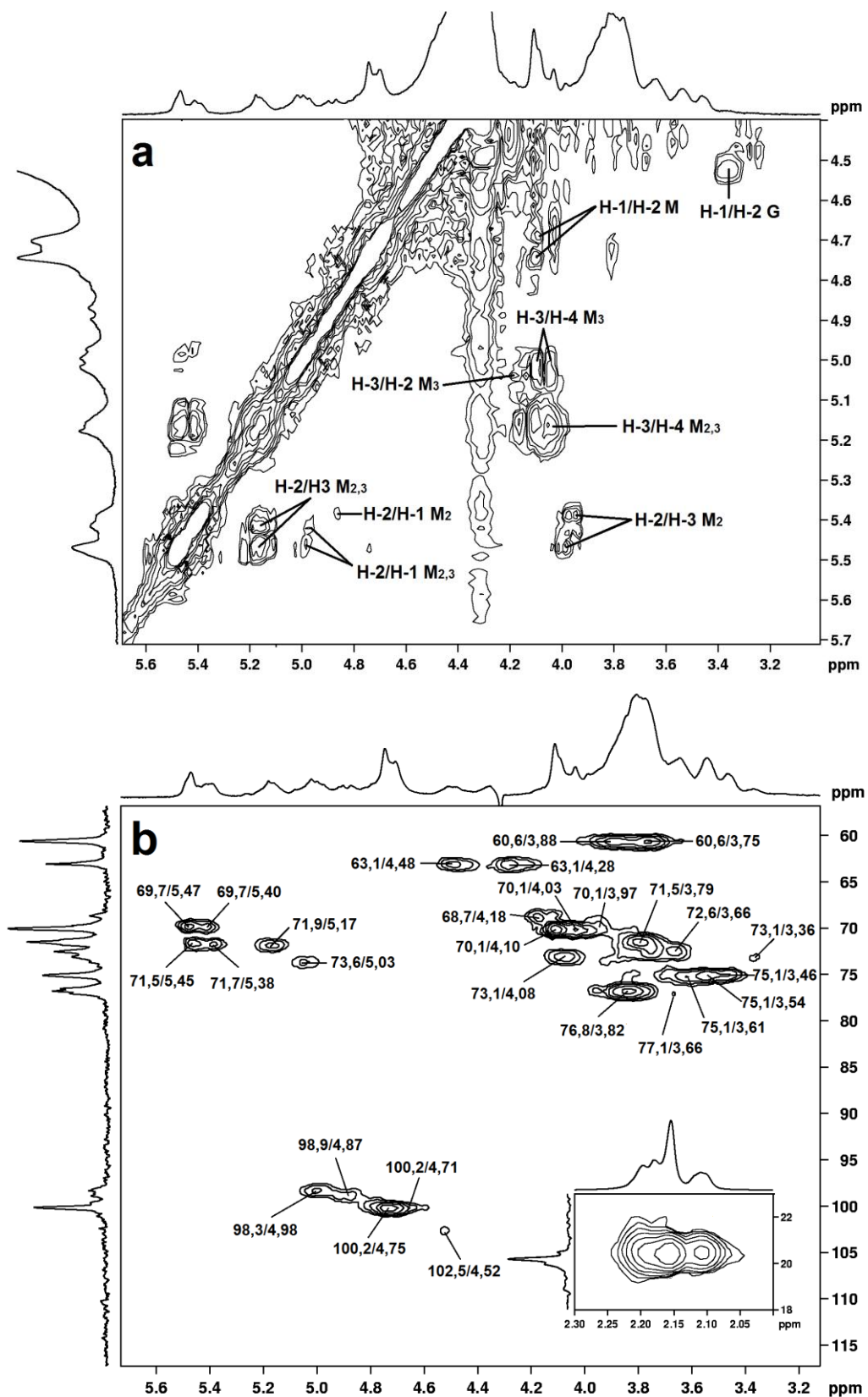


Figura 17 – Espectros de (a) COSY e (b) HSQC de FP, obtidos a 65 °C em D_2O .

Fonte: O autor.

No espectro de RMN de ^{13}C de FP, o sinal de muito baixa intensidade em 102,5 ppm (correlacionando com o H-1 em 4,52 ppm no experimento de HSQC) indica a presença de unidades β -glucopiranosil 4-ligadas. Correlações no experimento de HSQC em 73,1/3,36 e 77,1/3,66 ppm foram atribuídas a C-2/H-2 e C-4/H-4, respectivamente, das unidades acima mencionadas (CAPEK, ALFOLDI, LIŠKOVÁ, 2002; HANNUKSELA, PENHOAT, 2004; SIMS, CRAIK, BACIC, 1997) de acordo com a presença de resíduos de β -glucopiranosose 4-ligados como determinado por análise de metilação.

O espectro de RMN de ^{13}C de FP (Figura 15b) também apresentou sinais de carbonos metílicos em 20,2 (mais intenso) 20,0 (médio) e 20,5 (menor) ppm e carbonos carboxílicos (173,8 e 173,0 ppm) de grupos acetil, indicando que FP contém uma manana acetilada. O espectro de RMN de ^1H (Figura 16) desta fração apresentou quatro sinais correspondentes aos grupos metil em 2,15 (mais intenso), 2,10 (médio), 2,19 e 2,18 (menor) ppm, indicando que os grupos acetil, estão localizados em ambientes químicos diferentes. O espectro de HSQC mostrou que estes prótons metílicos estão correlacionados com os carbonos metílicos, acima mencionadas, de grupos acetil (20,2/2,15; 2,10; 20,0/2,18; 2,19 e 20,5/2,18, 2,19 ppm).

O espectro de HSQC de PF também apresentou correlações em 98,9/4,87 (C-1/H-1), 71,5/5,45 e 71,7/5,38 (C-2/H-2), 70,1/4,03 70,1/3,97 (C-3/H-3), atribuído a unidades β -manopiranosil 2-acetiladas (HANNUKSELA, PENHOAT, 2004; TELEMANN et al., 2003; VAN HAZENDONK et al., 1996). A presença de unidades de manose 2-O-acetiladas em diferentes ambientes químicos foi confirmada pelas correlações observadas no espectro de COSY correspondentes a H-1/H-2 (4,87/5,38 ppm) e dois conjuntos de H-2/H-3 (5,38/3,97 e 5,45/4,03 ppm). Estas atribuições estão de acordo com a descrição da literatura para polissacarídeos parcialmente acetilados, tal como uma glucomanana isolada de linho (*Linum usitatissimum* L.) (VAN HAZENDONK et al., 1996) e uma galactoglucomanana da madeira de abeto (HANNUKSELA, PENHOAT, 2004).

O espectro ^{13}C DEPT (Figura 18) de FP apresentou um sinal invertido em 63,1 ppm atribuído a C-6 das unidades manopiranosil 6-O-acetiladas. Esta ressonância foi deslocada para campo baixo (2,5 ppm) em comparação com C-6 não substituído (60,6 ppm, também DEPT invertido).

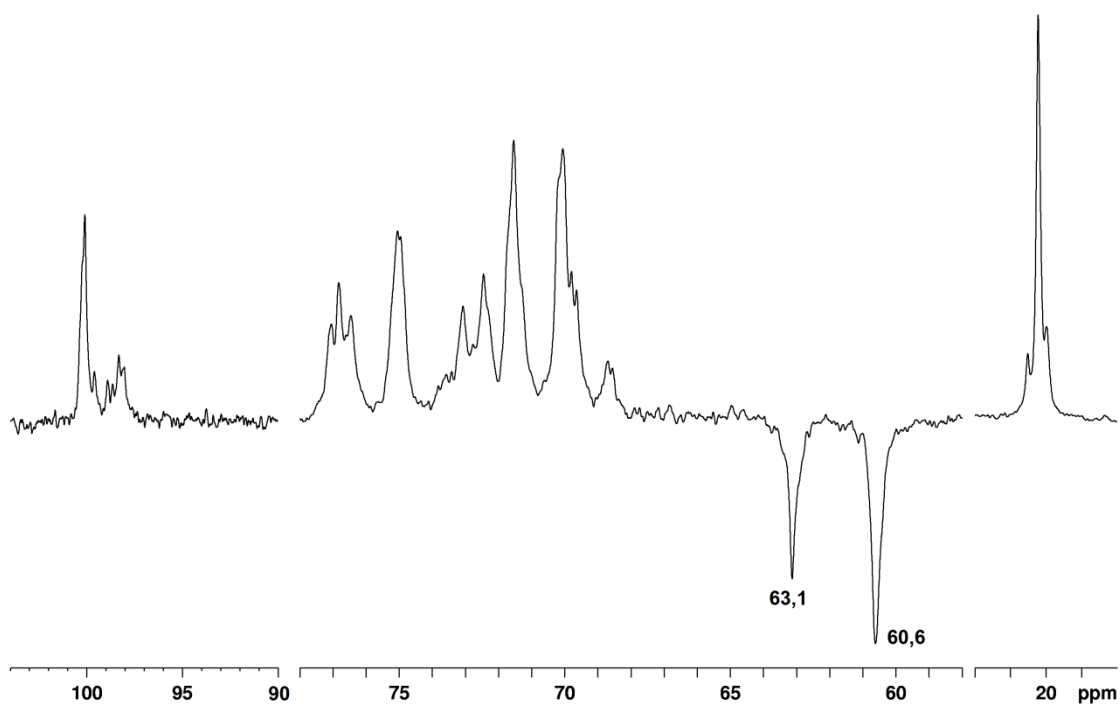


Figura 18 – Espectro de DEPT 135, relativo à FP obtido a 70°C em D₂O, usando acetona como padrão interno (30,2 ppm).

Fonte: O autor.

No espectro de RMN de ¹³C de FP o sinal de baixa intensidade em 99,7 ppm foi atribuído a C-1 de unidades β-manopiranosil 3-acetiladas, 4-ligadas (HANNUKSELA, PENHOAT, 2004; VAN HAZENDONK et al., 1996). Além disso, as correlações do espectro de HSQC em 68,7/4,18 e 73,6/5,03 ppm foram assinaladas para C-2/H-2 e C-3/H-3, respectivamente das unidades manopiranosil 3-acetilada, de acordo com a mudança para campo baixo de H-2, H-3 e C-3, bem como o deslocamento para campo alto de C-2, quando comparadas com as respectivas ressonâncias das unidades β-manopiranosil 4-ligadas (VAN HAZENDONK et al., 1996). Para as referidas unidades de manose acetiladas o espectro de COSY mostrou dois conjuntos de correlações H-3/H-4 (5,03/4,04 e 5,03/4,08 ppm), provavelmente, indicando diferenças no padrão de acetilação das unidades monossacarídicas vizinhas.

No espectro de HSQC as correlações anoméricas em 98,3/4,98 e 98,3/4,97 ppm em conjunto com outras em 69,7/5,47; 69,7/5,40 (C-2/H-2), 71,9/5,17 (C-3/H-3) e 73,1/4,08 (C-4/H-4) mostraram que FP também contém unidades de manose 2,3-diacetiladas. O espectro de COSY mostrou

correlações em 4,98/5,47 e 4,97/5,40 (H-1/H-2); 5,47/5,17 e 5,40/5,17 ppm (H-2/H-3) e 5,17/4,08 (H-3/H-4). Estes dados estão de acordo com o deslocamento para campo baixo dos prótons geminais H-2 (1,37-1,30 ppm) e H-3 (1,38 ppm) e os prótons vicinais (0,22 a 0,27 ppm para H-1 e 0,26 ppm para H-4), devido à presença de grupos acetil em ambos, O-2 e O-3 de unidades β -D-manopiranosil 4-ligadas.

No espectro de HSQC as correlações em 63,1/4,28; 4,48 ppm correspondentes aos C-6/H6a, b confirmaram que FP contém unidades manopiranosil C-6 substituídas por grupos acetil. Os deslocamentos para campo baixo de C-6, H-6a e H-6b das unidades manopiranosil 6-acetiladas (2,5, 0,53 e 0,60 ppm, respectivamente) estão em boa concordância com os valores relatados para as unidades de galactose 6-acetiladas no dissacarídeo β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Rha obtido a partir do exopolissacarídeo de bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (2,6 para C-6 e 0,53 ppm para H-6) (CESCUTTI et al., 2011). Para os glicolipídeos da membrana do eritrócito equino o H-6a e H-6b de galactose O-6 acetilada, mostrou um deslocamento para campo baixo de 0,77 e 0,84 ppm, respectivamente (YACHIDA, TSUCHIHASHI, GASA, 1997).

As ressonâncias do carbono C-6 de unidades não substituídas e acetiladas em C-6 apresentaram integrações relativas de 1:0,58 mostrando que FP representa 37% do total de unidades de manopiranosil contendo grupos acetil em O-6. Além disso, no espectro de HSQC de FP a correlação em 72,6/3,66 ppm foi atribuída a C-5/H-5 de unidades manopiranosil 6-O-acetiladas. Os deslocamentos de C-5 para campo alto (2,5 ppm) e H-5 para campo baixo (0,05 a 0,20 ppm) estão de acordo com o efeito do grupo acetil em C-6 no carbono e próton vicinal (CESCUTTI et al., 2011). A percentagem de 38% obtida a partir das integrações relativas das áreas de C-5, está de acordo com a determinada a partir das áreas dos carbonos C-6 (37%).

A localização dos grupos acetil em glucomananas parcialmente acetiladas isoladas de *A. barbadensis* e *A. plicatilis* foi estabelecida baseadas em análise de metilação (MANNA, McANALLEY, 1993; PAULSEN, FAGERHEIM, ØVERBYE, 1978), ou como para *A. arborescens*, com o uso adicional da análise espectroscópica de RMN de ^1H (WOZNIEWSKI, BLASCHEK, FRANZ, 1990). O polissacarídeo acetilado de *A. barbadensis*

estudado por Manna e McAnalley (1993) apresentou grupos acetil em O-2, 3 e O-6 das unidades de manose em uma proporção de cerca de 1:1. A análise de metilação e dados de RMN de ^1H mostraram que a glucomanana obtida a partir de *A. arborescens* apresenta proporções semelhantes de unidades de manose acetiladas nas posições de O-2,3,6, O-2,3 e O-6 além de pequenas quantidades de substituições acetil em O-3,6 (WOZNIEWSKI, BLASCHEK, FRANZ, 1990). Diferentemente, a glucomanana isolada de *A. plicatilis* contém unidades de manose e glucose substituídas por grupos acetil nas posições de O-2,3,6, O-2, 3 e O-3 (MANNA, McANALLEY, 1993; PAULSEN, FAGERHEIM, ØVERBYE, 1978) .

No presente trabalho, o padrão de acetilação da glucomanana de *A. barbadensis* foi pela primeira vez estabelecida através de análises de RMN bidimensionais. Por conseguinte, as técnicas de RMN, juntamente com as análises químicas mostram que FP consiste de uma β -D-glucomanana parcialmente acetilada 4-ligada, com os grupos acetil localizados em O-2,3, O-2, O-3, e O-6 de unidades manopiranosil.

5.4. Fracionamento da fração polissacarídica

A fração FP foi submetida a um fracionamento utilizando técnicas de microfiltração e diálise. O objetivo da aplicação destas metodologias na fração FP foi a obtenção de subfrações com diferentes massas moleculares para sua utilização nos testes de atividade biológica. A fração D1000R, retida na membrana de filtração de 0,45 μm e de dialise de 1000 kDa, foi a que concentrou a maior parte dos polissacarídeos presentes na fração FP.

As análises de HPSEC/MALLS/RI das frações com maior grau de homogeneidade são apresentadas na figura 19. A fração D1000R mostrou um perfil de eluição semelhante a FP, eluindo em um tempo de 38 min, como esperado, considerando que esta fração representa a maior parte da FP.

O perfil de HPSEC/MALLS/RI da fração D500D mostrou um pico largo e simétrico indicando uma fração polissacarídica homogênea, porém polidispersa. A massa molar calculada foi de 53,2 kDa ($dn/dc = 0,131 \text{ mL g}^{-1}$). Esta fração foi denominada de HP.

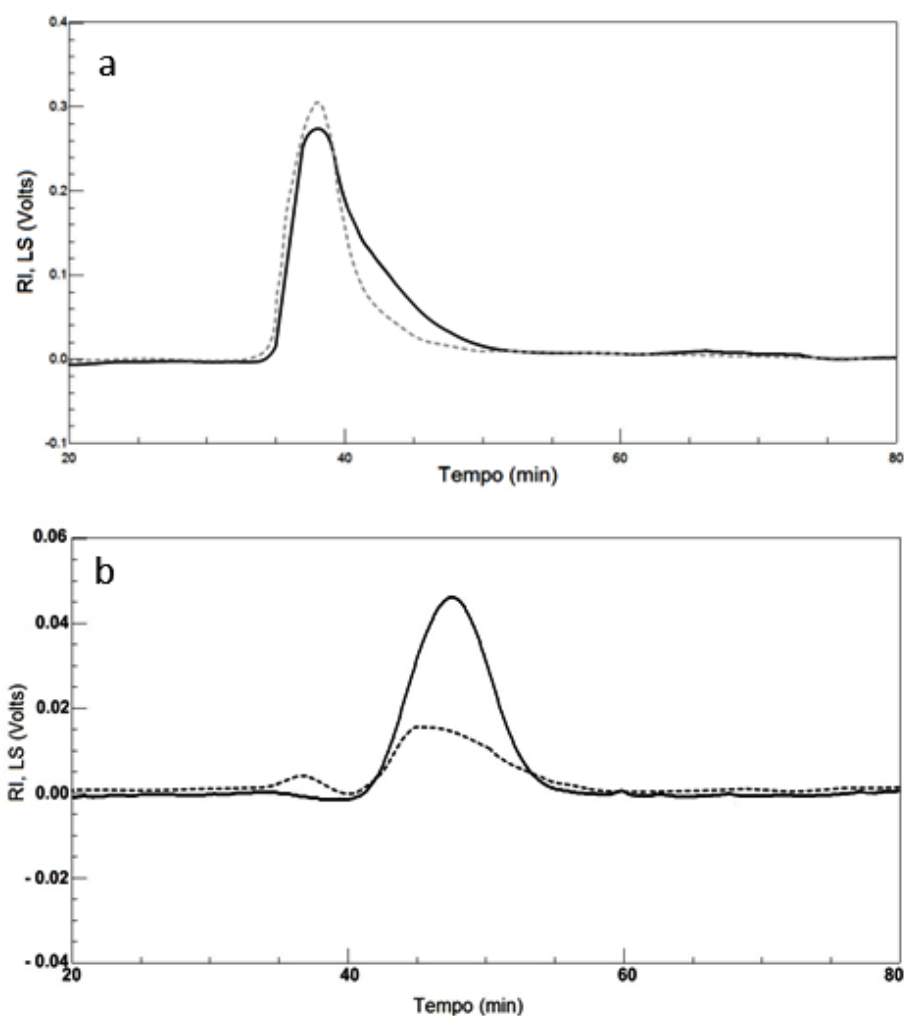


Figura 19 – Perfis de eluição em HPSEC-MALLS-RID das frações D1000R (a) e D500D (b). — RI, - - - MALLS.

Fonte: O autor

A composição monossacarídica de HP mostrou que esta compõe-se de manose (92,0%) e glucose (5,0%), onde a proporção manose:glucose foi de (18,4:1), além de 17,0% de acetil, cujo grau de substituição (DS) foi 0,77 (Tabela 4).

A molécula comercialmente denominada acemanana possui uma massa molar determinada, que varia entre 1000 a 1400 kDa (TALMADGE et al., 2004; CHOW et al., 2005), entretanto outras de massa molar semelhante também foram isoladas a partir do extrato aquoso de diferentes espécies de *Aloe*, como a de *A. arborescens* com 1000 kDa e de *A. plicatilis* com 1200 kDa

(PAULSEN, FAGERHEIM, ØVERBYE, 1978; WOZNIEWSKI, BLASCHEK, FRANZ, 1990).

Tabela 4 – Análise química da fração HP obtida a partir de FP

Amostra	Monossacarídeos (mol%) ^a			%		
	Man	Glc	AU ^b	Acetil	CHO ^c	PTN ^d
HP	92,0	5,0	3,0	17,0	64,0	tr. ^e

^a analisados em GLC na forma de acetato de alditóis.

^b ácidos urônicos.

^c CHO = carboidratos totais.

^d PTN = proteínas.

^e traços $\leq 1,5\%$.

Ainda sob esta óptica, diversas glucomananas acetiladas de massas moleculares menores são descritas na literatura. A exemplo disso, é descrito que em *A. barbadensis* foram isoladas glucomananas com 450 kDa (FARKAS, 1967), 200 kDa (GOWDA, NEELISIDDAIAH, ANJANEYALU, 1979), 174 e 39,7 kDa (CHUN-HUI et al., 2007). Para *A. arborescens* foi descrito um polissacarídeo de 12 kDa (WOZNIEWSKI, BLASCHEK, FRANZ, 1990) e em *A. vahombe* de 100 e 20 kDa, (VILKAS, RADJABI-NASSAB, 1986; RADJABI-NASSAB et al., 1984). HP apresenta semelhança de composição e massa molar, conforme o descrito na literatura, com mananas acetiladas lineares e algumas glucomananas obtidas de diferentes espécies do gênero *Aloe*. Em *A. vahombe*, foi encontrada uma glucomanana cuja proporção de Man:Glc foi de 3:1 (RADJABI, AMAR, VILKAS, 1983). Em um trabalho envolvendo o isolamento de polissacarídeos da espécie *A. barbadensis*, 4 frações polissacarídicas foram isoladas e nomeadas de A_{1a}, A_{1b}, A₂ e B, cujas proporções de Man:Glc foram respectivamente 1,5:1; 4,5:1; 13,5:1 e 19:1 (GOWDA, NEELISIDDAIAH, ANJANEYALU, 1979). Nesta mesma espécie, cultivada na China e irrigada com água do mar, foram identificadas duas glucomananas cuja proporção monossacarídica foi de 120:3:2 de Man:Gal:Glc e 296:36:1 de Man:Glc:Gal, respectivamente (CHUN-HUI et al., 2007). Femênia e colaboradores (2003) obtiveram uma galactoglucomanana purificada, com

uma razão molar de Man:Glc:Gal de 18,3:2,3:1. Da mesma forma, Chow e colaboradores (2005), ao analisarem uma glucomanana comercial (acemanann Hydrogel®) obtida de *A. barbadensis*, verificaram a presença majoritária de manose e glucose na proporção de 13,5:1, assim como Mandal e Das (1980b) que encontraram uma glucomanana cuja proporção foi de 22:1.

Como é observado nos cromatogramas da figura 19a, D1000R é a molécula de maior massa molar, que já havia sido descrita em FP, uma vez que D1000R é o composto principal daquela fração. Logo, toda a caracterização proposta para FP é válida para D1000R.

Em relação a HP (D500D), foram realizadas análises espectroscópicas de RMN uni e bidimensionais a fim de comparar sua estrutura àquela encontrada para FP-D1000R. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para a fração HP são mostrados na figura 20.

A fração HP possui a característica estrutural de FP, isto pode ser constatado ao analisar os espectros de RMN unidimensionais, onde, por comparação com FP, os sinais encontrados se mantiveram. O espectro de RMN de ^1H de HP (Figura 20a) apresenta elevada resolução, quando comparado ao espectro de FP (Figura 15b). Os sinais em 5,39; 5,16; 5,00; 4,97; 4,90; 4,87 e 4,72 ppm, da região anomérica puderam ser melhor observados, em relação a FP. Também os sinais do espectro de RMN de ^{13}C comportaram-se de maneira similar. O sinal de C-1 em 93,8 ppm, indica a presença de unidades de manose redutora, correlacionado no espectro de HSQC (Figura 21) com os prótons 5,18 e 4,40 ppm (H-1 de α e β -manopiranosil 4-ligadas, respectivamente).

Esta fração possui uma massa molar relativamente baixa sendo por isso possível observar estes sinais das extremidades redutoras. O espectro de RMN de ^{13}C de HP (Figura 20b) apresentou 2 sinais principais na região anomérica, em 100,1 e 98,3 ppm, atribuídos ao C-1 das unidades β -D-manopiranosil 4-ligadas e β -D-manopiranosil 4-ligadas 2,3-diacetiladas, respectivamente. Outros sinais anoméricos, de menor intensidade, também são observados em 99,7 ppm, referente as unidades β -D-manopiranosil 3-acetiladas, 4-ligadas (HANNUKSELA, PENHOAT, 2004; VAN HAZENDONK et al., 1996), 98,9 ppm a β -D-manopiranosil 2-acetiladas (HANNUKSELA,

PENHOAT, 2004; TELEMAN et al., 2003) e em 102,4 ppm a β -D-glucopiranosil 4-ligadas.

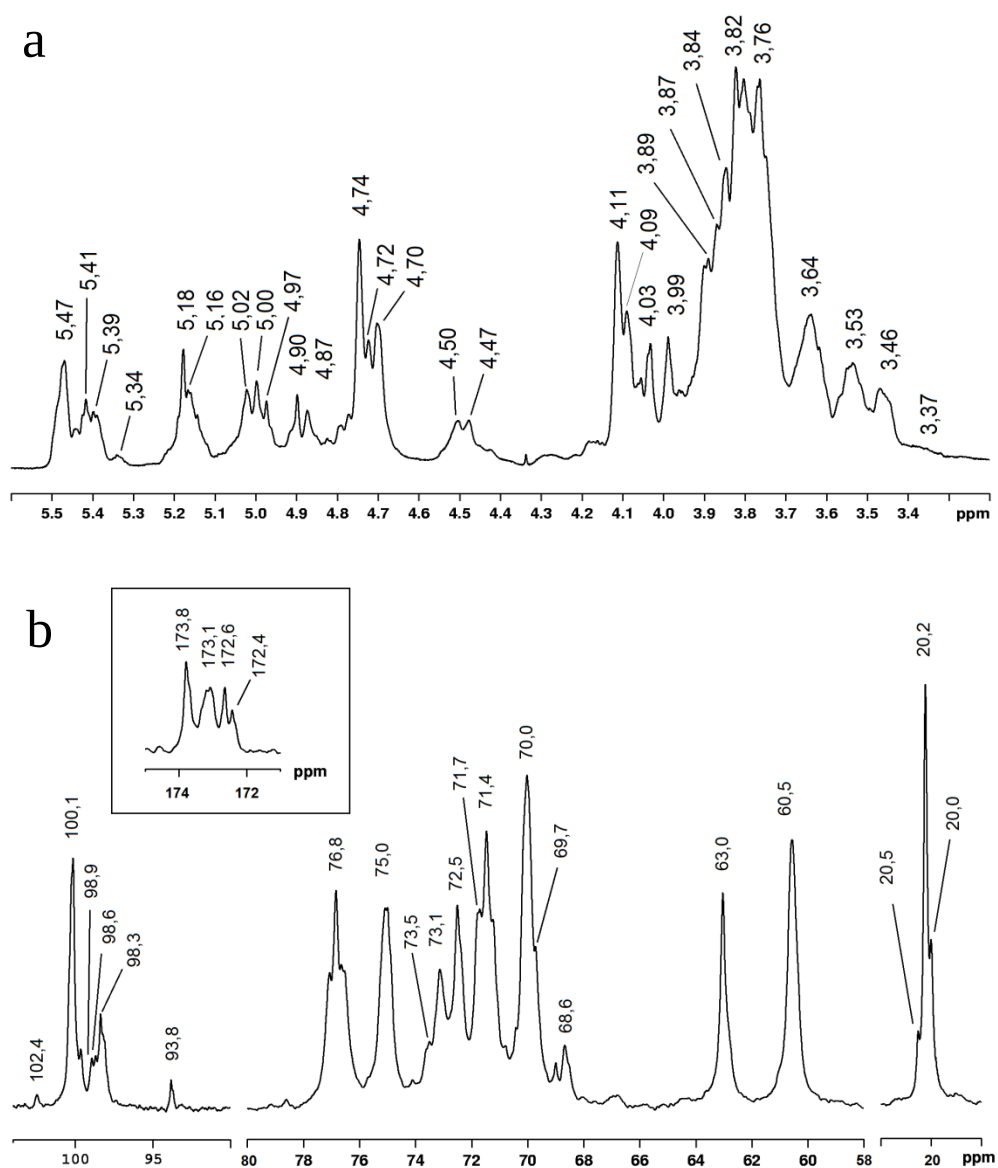


Figura 20 – Espectros de RMN de ^1H (a) e ^{13}C (b) da fração HP. Espectros obtidos a 65°C em D_2O , usando acetona como padrão interno (2,22 e 30,2 ppm).

Fonte: O autor.

O espectro de HSQC de HP (Figura 21) ilustra as correlações encontradas para esta fração polissacarídica.

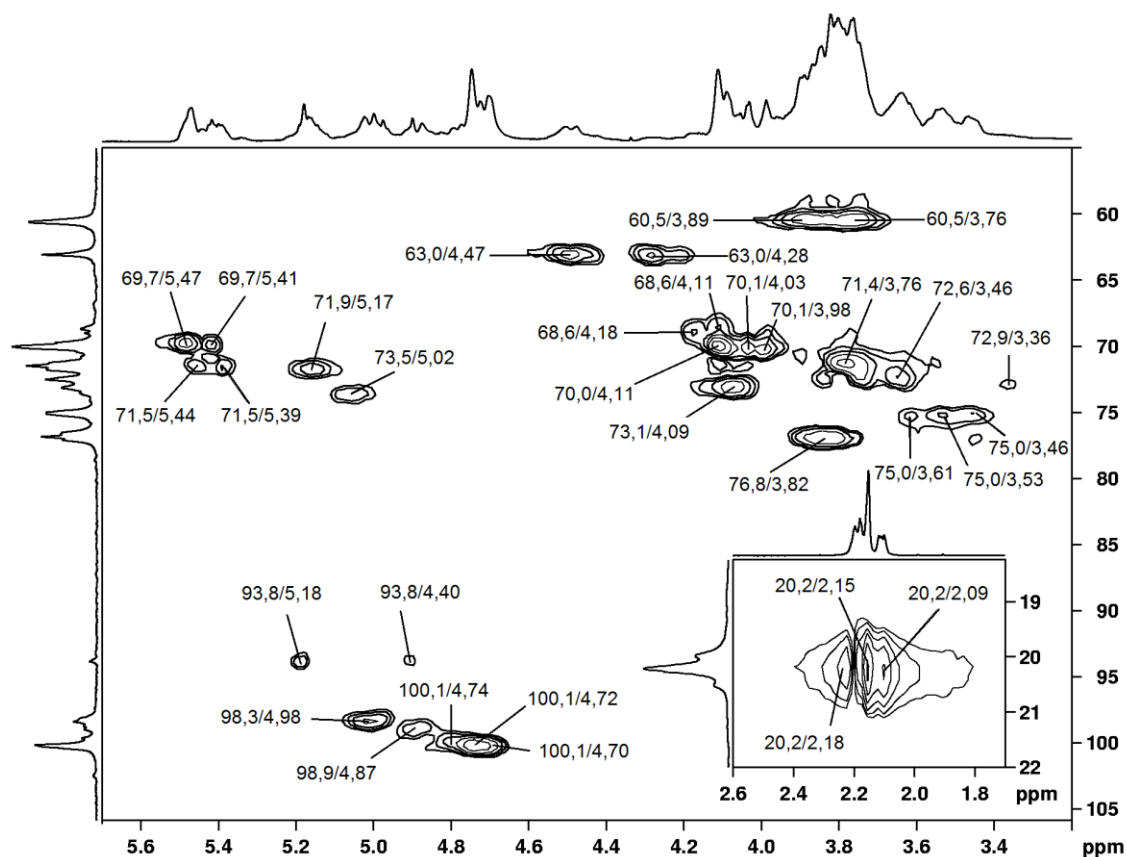


Figura 21 – Espectro de HSQC da fração HP. Espectro obtido a 65°C em D₂O.

Fonte: O autor.

Os carbonos metílicos observados no espectro de RMN de ^{13}C de HP (Figura 20b) apresentaram sinais em 20,2 (maior) 20,0 (médio) e 20,5 (menor) ppm e carbonos carboxílicos (173,8; 173,1; 172,6 e 172,4 ppm), indicando que trata-se de uma manana acetilada. O espectro de HSQC mostrou as correlações entre os prótons e os carbonos metílicos, dos grupos acetil (20,2/2,15; 2,09 e 2,18 ppm).

As análises de RMN demonstram que a fração polissacarídica HP é semelhante em termos de estrutura química a FP porém com massa molar menor.

5.5. Obtenção de produtos por hidrólise enzimática

Com o objetivo de obter produtos de hidrólise enzimática: oligossacarídeos e frações parcialmente despolimerizadas, a fração FP foi

submetida à hidrólise enzimática parcial, utilizando diferentes enzimas, conforme apresentado no item 5.5.1 – 5.5.4.

5.5.1. Tratamento da FP nativa com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase

A FP nativa foi submetida a ação da enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase e a reação foi acompanhada por 24 h, pelos métodos para a detecção de açúcares redutores e carboidratos totais, conforme mostrado na figura 22a.

O conteúdo de carboidratos totais durante o período da reação não sofreu alteração, indicando que os carboidratos não sofreram degradação. Já na curva referente à dosagem de açúcares redutores, nota-se um aumento, que atinge valor constante a partir das 6 h de hidrólise, indicando que neste tempo foi atingido o máximo de hidrólise possível com a enzima e condições testadas. Ao longo da reação, no entanto, a concentração de unidades redutoras foi sendo detectada até que no tempo de cerca de 8 h até 24 h, não foi observada diferença na concentração destas unidades. Diante dessa análise, o tempo de reação para obtenção de oligossacarídeos nativos utilizando a enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase foi determinado em 8 h.

O meio reacional após 8 h foi fervido, para inativação da enzima, resfriado e filtrado em membrana de 0,45 μ m. O retido, nesta filtração, representou 6,5% de massa seca, em relação à FP.

O filtrado resultante foi congelado e liofilizado. Este material foi então submetido à cromatografia de coluna utilizando como fase fixa BioGel P2 (faixa de fracionamento 1800 – 100 Da), a fim de isolar os oligossacarídeos formados na reação. Optou-se por separar o material excluído, subfração 1 (190-230 mL) dos oligossacarídeos, subfração 2 (230 – 500 mL), conforme mostrado na figura 22b.

A sub-fração 2, contendo carboidratos de menores massas molares, foram recromatografados em coluna de Biogel P2, a fim de retirar os sais do tampão, presentes no meio reacional e possibilitar a realização de uma análise de espectrometria de massas tipo MALDI-TOF. A figura 23 ilustra o resultado desta análise.

A análise apresentou um conjunto de íons massas variável entre 500 a 2000 m/z, confirmando a presença de oligossacarídeos gerados pela hidrólise enzimática. Sabendo-se que a fração nativa contém grupamentos acetil, os oligossacarídeos gerados deveriam possuir também um número semelhante destes grupamentos.

Os íons encontrados na análise e massas foram identificados neste trabalho como $[M+Na]^+$. Uma vez que não é possível distinguir as naturezas isoméricas de glucose ou manose assim são representados como “Hex” (hexoses).

A análise por MALDI-TOF permitiu identificar uma população de oligossacarídeos constituídos por unidades de hexose, com diferentes graus de acetilação. Foram identificados: Tetrassacarídeos (Hex_4) com 4 (m/z 857,9) e 5 (m/z 900,0) grupos acetil; pentassacarídeos (Hex_5) com 3 (m/z 978,0), 4 (m/z 1020,1), 5 (m/z 1062,2) e 6 (m/z 1104,2) grupos acetil. Também foram identificados Hex_6 até Hex_9 , contendo de 3 a 9 grupos acetil, conforme demonstrado na tabela 5.

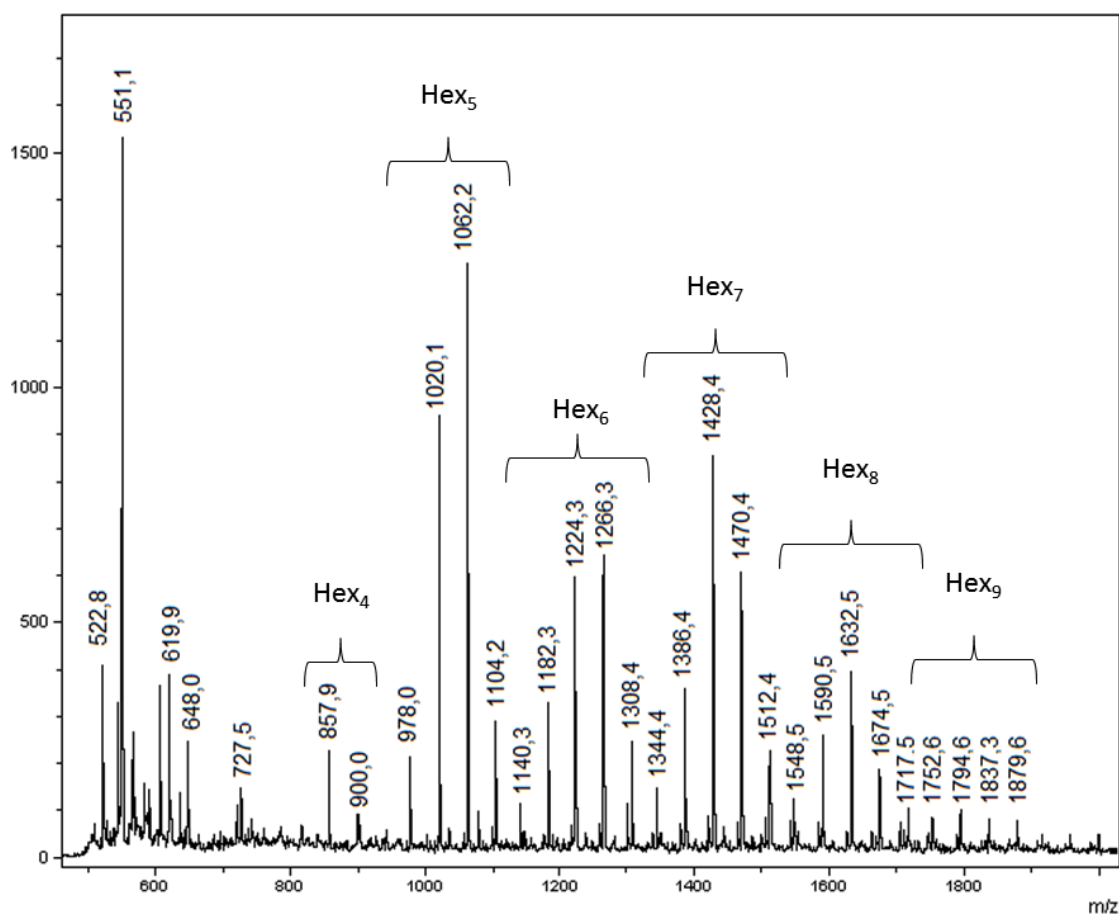


Figura 23 – Espectro de massas MALDI-TOF da sub-fração 2.

Fonte: O autor.

Tabela 5 – Identificação dos principais oligossacarídeos presentes no espectro da figura 23.

		Número de grupos acetil						
		3	4	5	6	7	8	9
n	m/z							
Hex _n	4		857,9	900,0				
	5	978,0	1020,1	1062,2	1104,2			
	6	1140,3	1182,3	1224,3	1266,3	1308,3		
	7		1344,4	1386,4	1428,4	1470,4	1512,4	
	8			1548,5	1590,5	1632,5	1674,5	1717,5 ^a
	9				1752,6	1794,6	1837,3 ^b	1879,6 ^c

Valor teórico: ^a 1715,5; ^b 1836,5; ^c 1878,5.

Valores abaixo de 400 m/z não foram identificados, uma vez que a análise por MALDI-TOF sofre interferências com a matriz, não sendo possível assinalar com confiabilidade massas abaixo deste valor (KABEL, SCHOLS, VORAGEN, 2001).

Na reação de FP com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase, a subfração 1, excluída de Biogel P2, foi analisado por HPSEC/MALLS/RI (Figura 24).

A análise mostrou que este, possui um perfil unimodal, de polidispersividade de 1,50. O tempo de eluição foi determinado entre 52 e 63 min, configurando desta forma uma molécula de pequena massa molar, que foi calculado em 3,88 kDa. O produto isolado foi denominado SP e caracterizado como um polissacarídeo de baixa massa molar formado por 98% de manose, 2% de glucose e com 15% de acetilação, o que corresponde a um grau de substituição (DS) de 0,66.

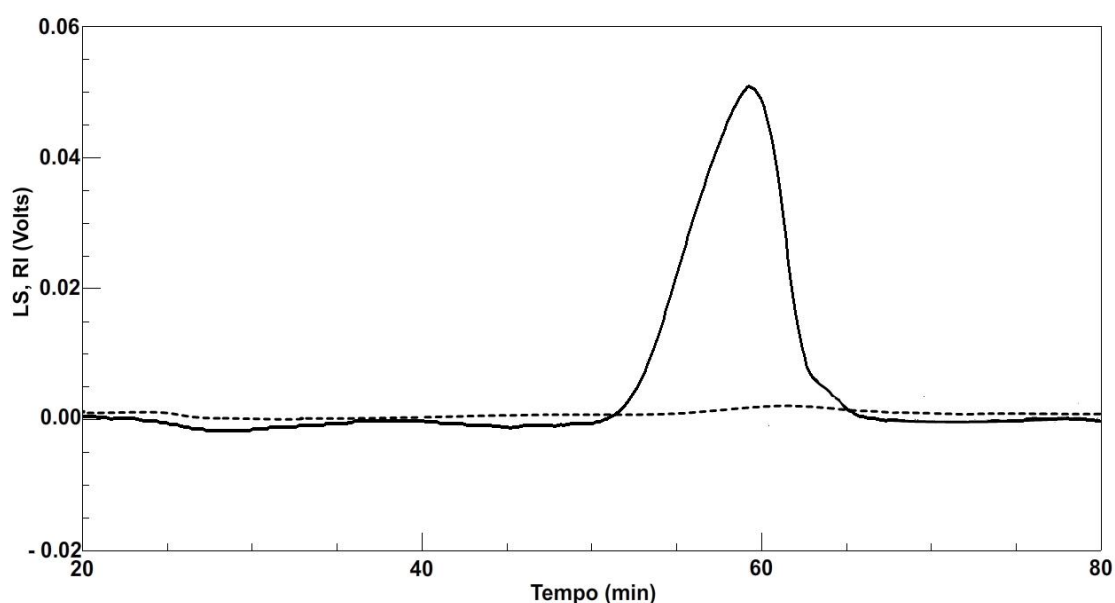


Figura 24 – Perfis de eluição em HPSEC/MALLS/RID da fração SP. — RI, - - - MALLS.

Sabendo-se que as análises de composição mostraram que este polissacarídeo mantém as características da molécula FP, a próxima etapa foi caracterizar a molécula SP através de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional e assim foi possível a atribuição dos deslocamentos químicos (Tabela 6).

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 25) mostraram que SP é estruturalmente semelhante à FP, diferindo em massa molar, porém não menos complexo.

A partir dos sinais obtidos, pode-se inferir que a molécula de SP é constituída por uma manana linear β -(1 $\rightarrow$ 4)-ligada, com acetilações em C-2, C-3, C-2/C-3 e C-6 nas unidades de manose. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25b), não foi possível observar a presença de glucose, provavelmente devido à sua baixa razão molar (~ 2%). Os dados encontrados corroboram com a idéia de que a molécula é composta principalmente por manose com unidades de glucose e com um grau de acetilação menor do que FP (18,4%). Entretanto, a razão molar manose:glucose encontrada para SP (49:1), mostrou uma predominância das unidades de manose em relação à glucose quando comparadas a FP (24:1).

Na região de impressão digital do espectro de RMN de ^1H , entre 4,4 e 5,6 ppm (Figura 25a) é possível assinalar os sinais atribuídos aos prótons anoméricos de $\rightarrow$ 4)- β -D-Manp-(1 $\rightarrow$ para aquelas moléculas constituídas por mananas acetiladas e identificar os prótons de extremidades redutoras α (5,18 ppm) e β (4,89 ppm) (TELEMAN et al., 2003; HSIEH et al., 2008).

De acordo com os assinalamentos de β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-Manp, os átomos de carbono anomérico possuem deslocamento químico em 100,1 ppm a 98,2 ppm. Comparando as intensidades relativas destes sinais, observamos uma relação de 2:1. O aumento desta intensidade demonstra que SP possui uma concentração de substituintes acetil em C-2, C-2/C-3 em comparação à FP. Os sinais em 63,0 e 60,6 ppm apresentaram uma intensidade relativa de cerca de 1:0,8. Como o sinal em 63,0 ppm indica C-6 substituído por grupamentos acetil, é possível observar que SP apresenta um maior número destes substituintes em C-6. Quando comparados a FP, observa-se a predominância de C-6 sem substituição.

Sinais em 20,1-2,10; 2,15 e 2,20 ppm e 172,2, 172,4, 172,8 e 173,6 ppm, remetem à grupos acetil, o que está de acordo com a literatura (LUNDQVIST et al., 2002). Além disso, os sinais em 4,15 e 5,38 ppm indicam que os grupos acetil localizam-se em C-6, C-2/C-3, respectivamente (PAULSEN, FAGERHEIM, ØVERBYE, 1978; ISHURD et al., 2006).

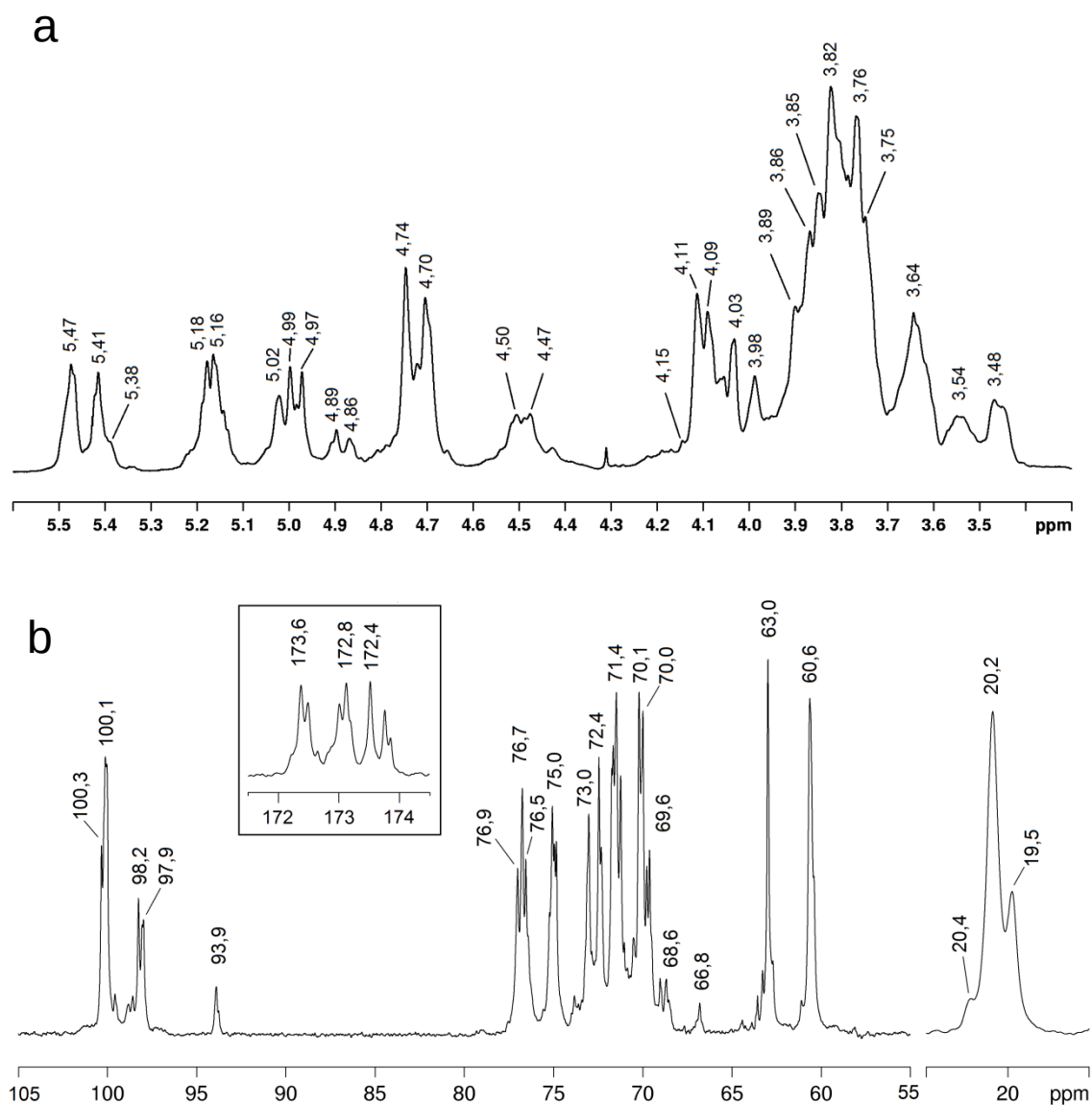


Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H (a) e RMN de ^{13}C (b) da fração SP. Os espectros foram adquiridos em D_2O a 65°C , usando acetona como padrão interno (2,22 e 30,2 ppm).

Fonte: O autor.

Tabela 6 – Assinalamento dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H da fração SP

Unidades ^a	Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C e ¹ H (ppm) ^b									
	C-1 H-1	C-2 H-2		C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5			C-6 H-6a, b	
M red α	93,9									
	5,18									
M red β	93,9									
	4,89									
M	100,1	70,1		72,4	76,7	75,0	75,0	75,0	60,6	60,6
	4,74	4,11		3,64	3,82	3,64	3,54	3,48	3,75	3,89
M2Ac	98,2	71,4	71,4	70,0	76,7	75,0	75,0	75,0	63,0	63,0
	4,97	5,47	5,38	4,11	3,85	3,64	3,54	3,48	4,29	4,47
M2,3Ac	98,2	69,6	68,6	71,8	73,0	75,0	75,0	75,0	60,6	60,6
	5,02	5,47	5,41	5,16	4,09	3,64	3,54	3,48	3,75	3,89
M3Ac	100,1	70,1		73,6	73,0					
	4,70	4,15		5,02	4,09					
M6Ac										

^a A designação usada: M red, Manose não acetilada em terminais redutores; M, Manose não acetilada; M2Ac, manose 2-O-acetilada; M2,3Ac, manose 2,3-O-acetilada; M3Ac, manose 3-O-acetilada; M6Ac, manose 6-O-acetilada.

^b Relativo ao padrão interno – acetona 30,2 e 2,224 ppm (D_2O , 65°C, adquirido a 400 MHz)

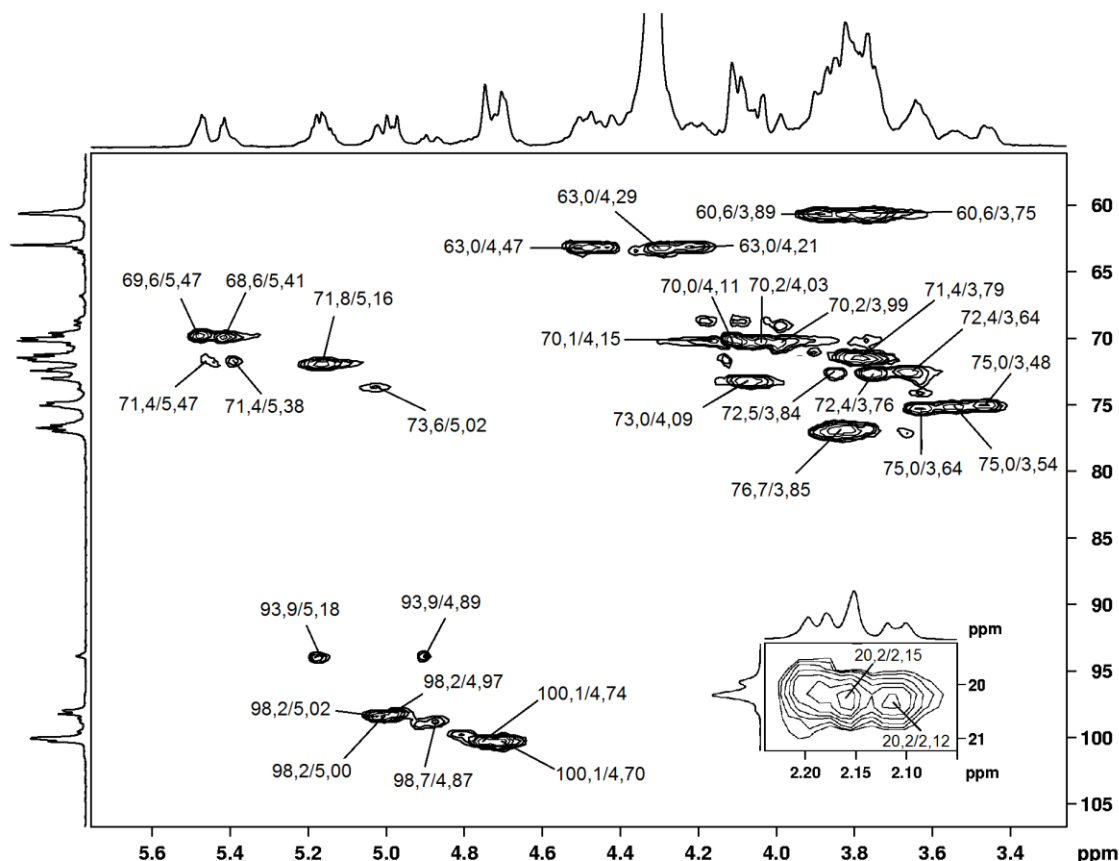


Figura 26 – Espectro de HSQC da molécula SP, obtido a 65 °C em D₂O.

Fonte: O autor.

5.5.2. FP desacetilada tratada com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase

A fração FP foi submetida ao processo de desacetilação e sequencialmente tratada com a enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase. A figura 27a ilustra a cinética de hidrólise enzimática desta fração.

Os primeiros dois pontos da curva relativa a carboidratos totais apresentaram um valor abaixo do esperado devido a baixa solubilidade da FP desacetilada. A absorbância encontrada a partir da 8^a hora de reação foi de 0,47 e este manteve-se constante até o final do tratamento enzimático. Comparando os dois gráficos (Figura 27a e 22a), é possível observar que a amostra desacetilada mostrou uma absorbância maior para açúcares redutores (DNS) (aproximadamente 0,5 em relação a 0,35 para FP nativa), indicando que a hidrólise enzimática parcial da FP desacetilada gerou oligossacarídeos menores.

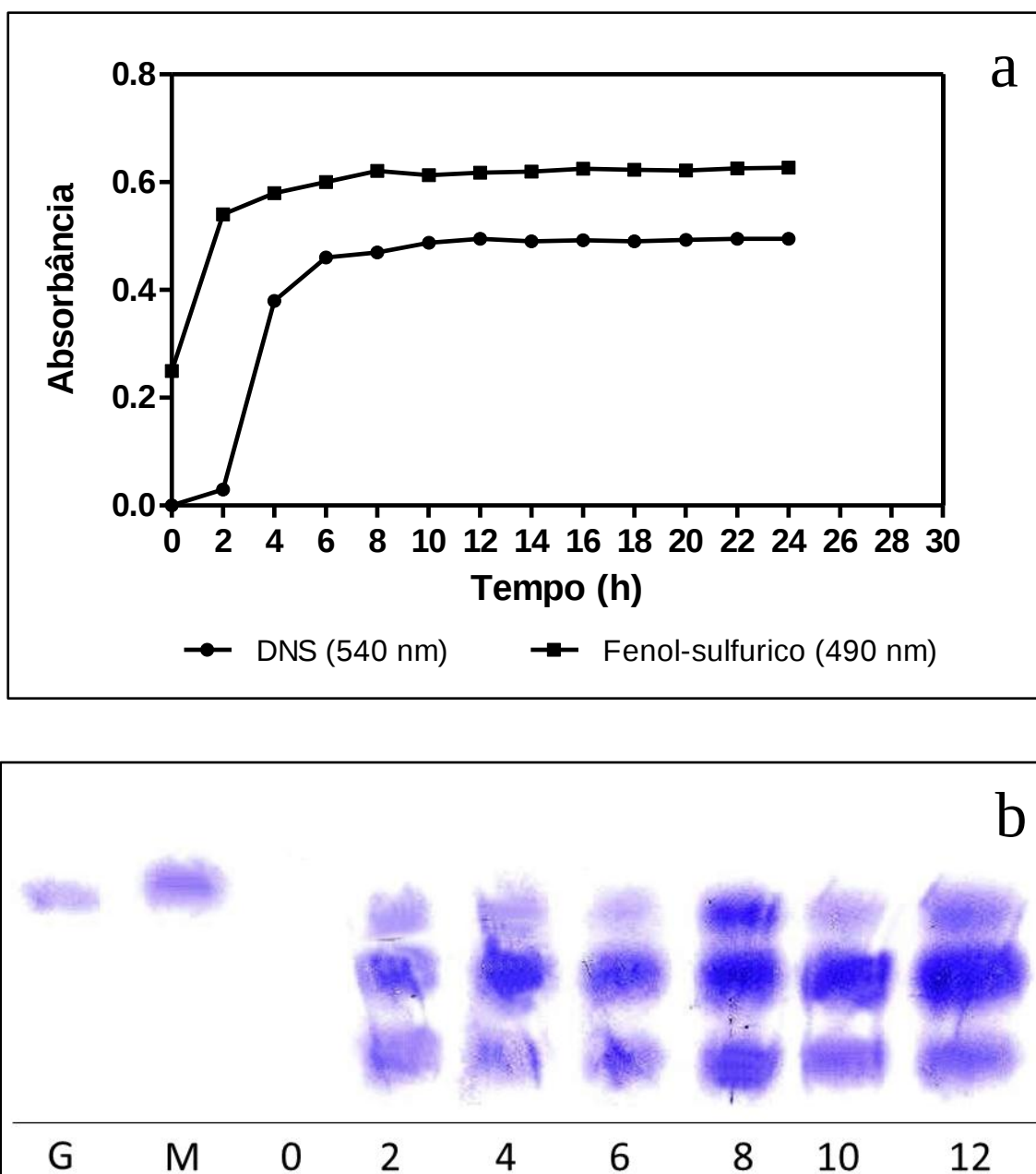


Figura 27 – Cinética da hidrólise enzimática de FP desacetilada sob ação da enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase (a) e cromatografia em camada delgada referente à hidrólise da FP desacetilada pela enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase. G = glucose, M = manose, os números de 0 a 12 representam o tempo em horas da reação (b).

Fonte: O autor.

O tempo de hidrólise para este tratamento foi estipulado em 8 h, uma vez que a partir deste tempo, a curva manteve-se estável. O resultado da hidrólise foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD), por 12 h utilizando Man e Glc como padrões (Figura 27b).

A análise por CCD do material hidrolisado mostrou que a partir do tempo de 2 h foi possível observar a formação de 3 bandas distintas que se mantiveram ao longo do tempo de ensaio, apenas diferindo na intensidade.

Após o tempo de 12 h de tratamento enzimático, o meio reacional foi fervido (10 min) para a inativação da enzima, resfriado e filtrado em membrana de 0,45 μm . O material retido na filtração apresentou um rendimento de 72% em relação à massa inicial de FP. O retido foi analisado através de espectroscopia de infravermelho (IR), uma vez que este mostrou-se insolúvel em todos os solventes testados de forma que não foi possível realizar um espectro de RMN de ^{13}C . A figura 28 apresenta os espectros de infravermelho de FP e do material resistente a hidrólise enzimática.

Como pode ser observado no espectro de IR, a amostra apresentou as bandas características de carboidratos entre 900-1200 cm^{-1} . A banda na região 1740 cm^{-1} , é característica do estiramento de ligação $\text{C}=\text{O}$, e pode ser assinalada aos grupamentos acetil (LAMBERT et al., 1998; PRASHANTH et al., 2006; CAMPESTRINI, 2007). Esta banda intensa na molécula nativa, não aparece na amostra desacetilada, confirmando tratar-se de uma molécula de carboidrato isenta de seu grupamento acetil original, o que pode explicar a insolubilidade da amostra (DU et al., 2012).

A absorção em 1435 e 1380 cm^{-1} foi possivelmente devido às torções de grupos CH_3 não-simétricos e simétricos respectivamente e a banda em 1250 cm^{-1} representa o estiramento de grupos $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ não-simétricos (CHUN-HUI et al., 2007). O conjunto de bandas de 900 a 1200 cm^{-1} é chamada de região de impressão digital de carboidratos por conter grupos $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ e $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ (XIONG et al., 2011).

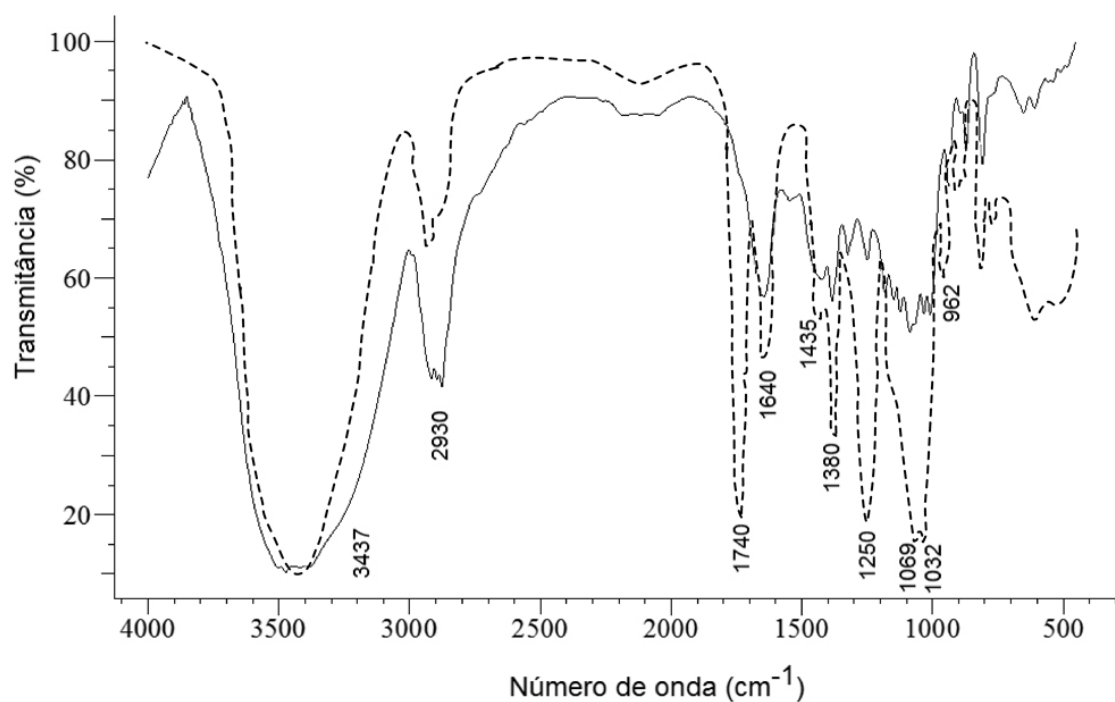


Figura 28 – Espectro de IR da FP (—) e do material resistente a hidrólise enzimática (- - -) pela β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase.

Fonte: O autor.

A composição monossacarídica do material resistente a hidrólise enzimática apresentou 95% de manose e 5% de glucose.

Para isolar cada um dos compostos, o hidrolisado foi posteriormente submetido à cromatografia em coluna de gel permeação em Biogel P2 (Figura 29a). A partir da cromatografia, foi possível isolar os compostos observados na CCD, nomeados pelos números 1, 2 e 3. Os picos assim obtidos foram re-analisados em CCD com o intuito de confirmar o isolamento e o perfil destas frações (Figura 29b).

As bandas observadas na CCD mostraram boa separação das três sub-frações representadas pelo número 3. Cada sub-fração isolada esta representada pelos picos 1(Rf 0,15), 2 (Rf 0,33) e 3 (Rf 0,67).

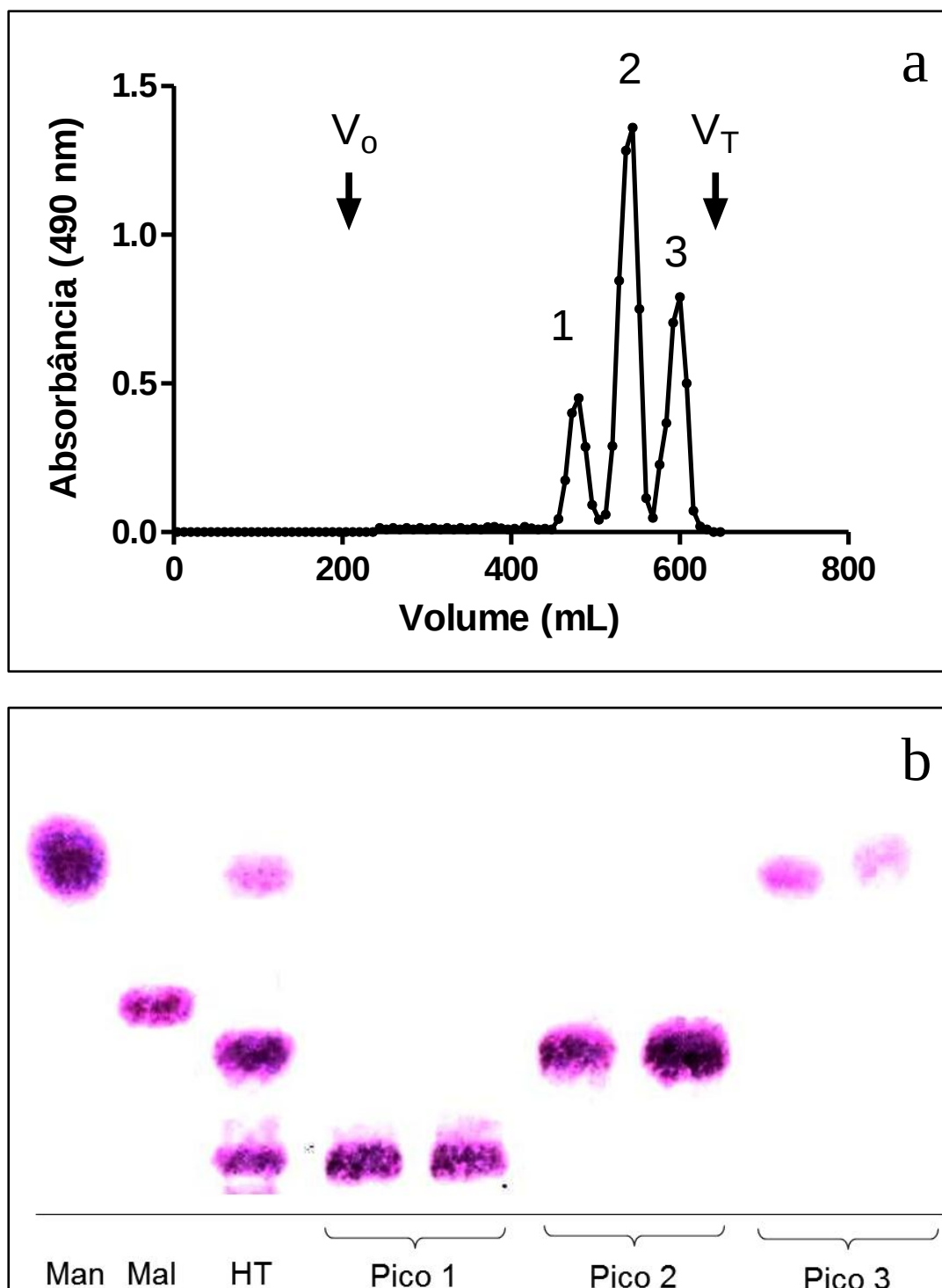


Figura 29 – Cromatografia em Biogel P2 do hidrolisado solúvel após tratamento com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase da fração FP (a) e CCD dos compostos isolados da FP desacetilada hidrolisada com a enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase, através da cromatografia em coluna (CC). Man, manose; Mal, maltose e HT, hidrolisado total (b).

Fonte: O autor.

Uma vez isolados, os compostos foram submetidos à análise por ESI-MS (Figura 30). Os picos 1 e 2, apresentaram como íon principal 527,4 (Figura 30b) e 365,3 m/z (Figura 30a), respectivamente, sendo identificados como trissacarídeo e dissacarídeo, constituídos por hexoses. O pico 3 da cromatografia foi confirmado como sendo um monossacarídeo (hexose).

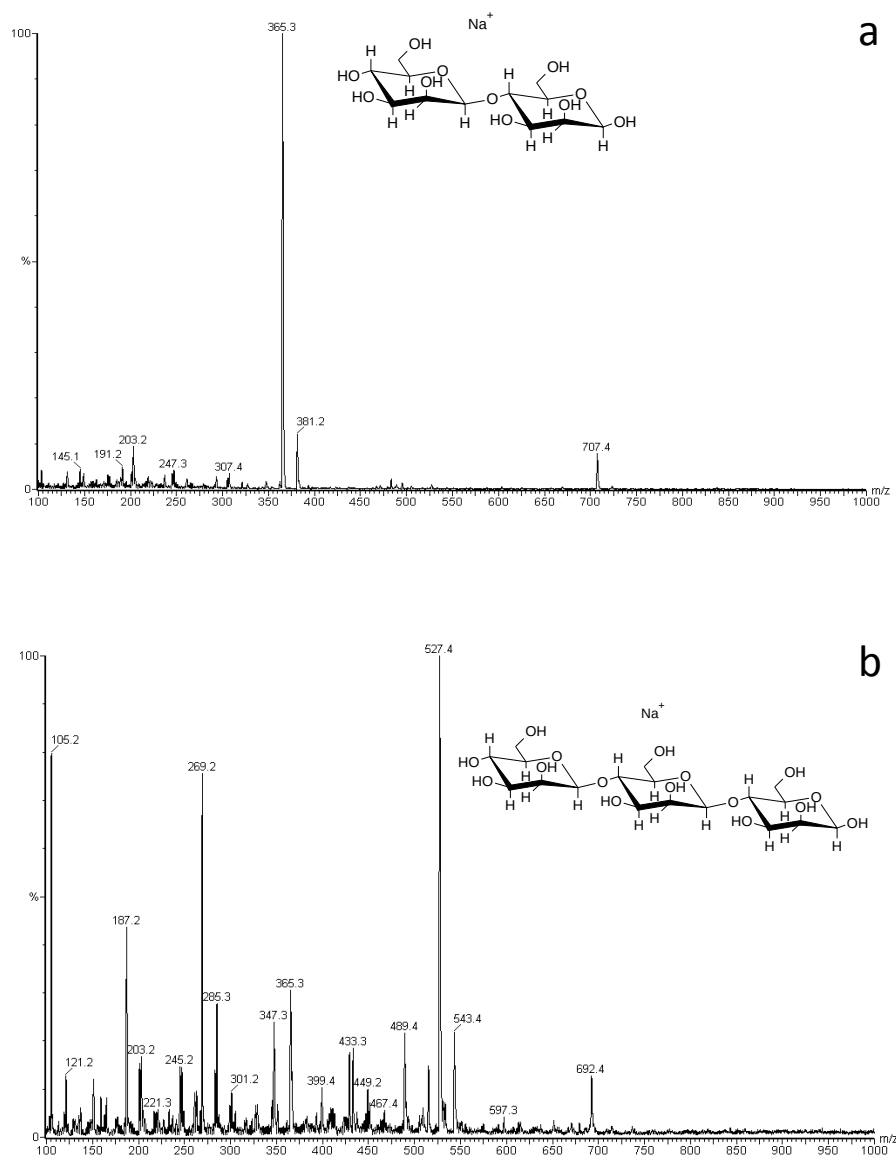


Figura 30 – Perfis de ESI-MS dos produtos purificados do tratamento com a glucanase da fração FP desacetilada. Em (a), dissacarídeo correspondente ao pico 2 da CC, em (b), trissacarídeo correspondente ao pico 1 da CC.

Fonte: O autor.

Um resultado semelhante foi obtido por Cescutti e colaboradores (2002), a partir de glucomananas de *konjac*. As glucomananas (0,07 acetil/monossacarídeos) foram tratadas com complexo de celulase do qual faz parte a enzima (1→4)- β -D-glucosidase, originando mono-, di- e trissacarídeos. Contudo, a retirada dos grupos acetil da molécula de glucomanana de *Aloe* foi, no presente trabalho, o diferencial para a obtenção das três espécies químicas.

5.5.3. FP nativa tratada com β -endo-1,4-D-mananase

A FP nativa também foi tratada com a enzima β -endo-1,4-D-mananase. Primeiramente estabeleceu-se a cinética da reação (Figura 31a) a fim de determinar a melhor condição para a obtenção de oligossacarídeos.

Não foi possível detectar alterações do poder redutor ao longo das 24 h de tratamento enzimático. A reação não gerou moléculas com terminais redutores detectáveis no volume de meio reacional utilizado para o ensaio de DNS. Após filtração do meio reacional em membrana de 0,45 μ m, o retido representou 6,5% do material inicial.

A exemplo do relatado para os outros tratamentos enzimáticos, também utilizou-se a cromatografia de exclusão em BioGel P2 para pesquisar o perfil de eluição do hidrolisado. O resultado da cromatografia pode ser observado na figura 31b.

A cromatografia apresentou um pico único, que inicia a eluição em 230 mL (volume morto da coluna), evidenciando que o tratamento enzimático não produziu oligossacarídeos.

A análise de HPSEC/MALLS/RI da fração excluída em BioGel P2 revelou um pico, eluindo entre 40,7 e 54,2 min (Figura 32). Esta fração foi denominada de MNR2. O produto de hidrólise (Dn/Dc 0,134) teve sua massa molar em 191,6 kDa, indicando que o polissacarídeo nativo FP (1230 kDa), foi parcialmente despolimerizado.

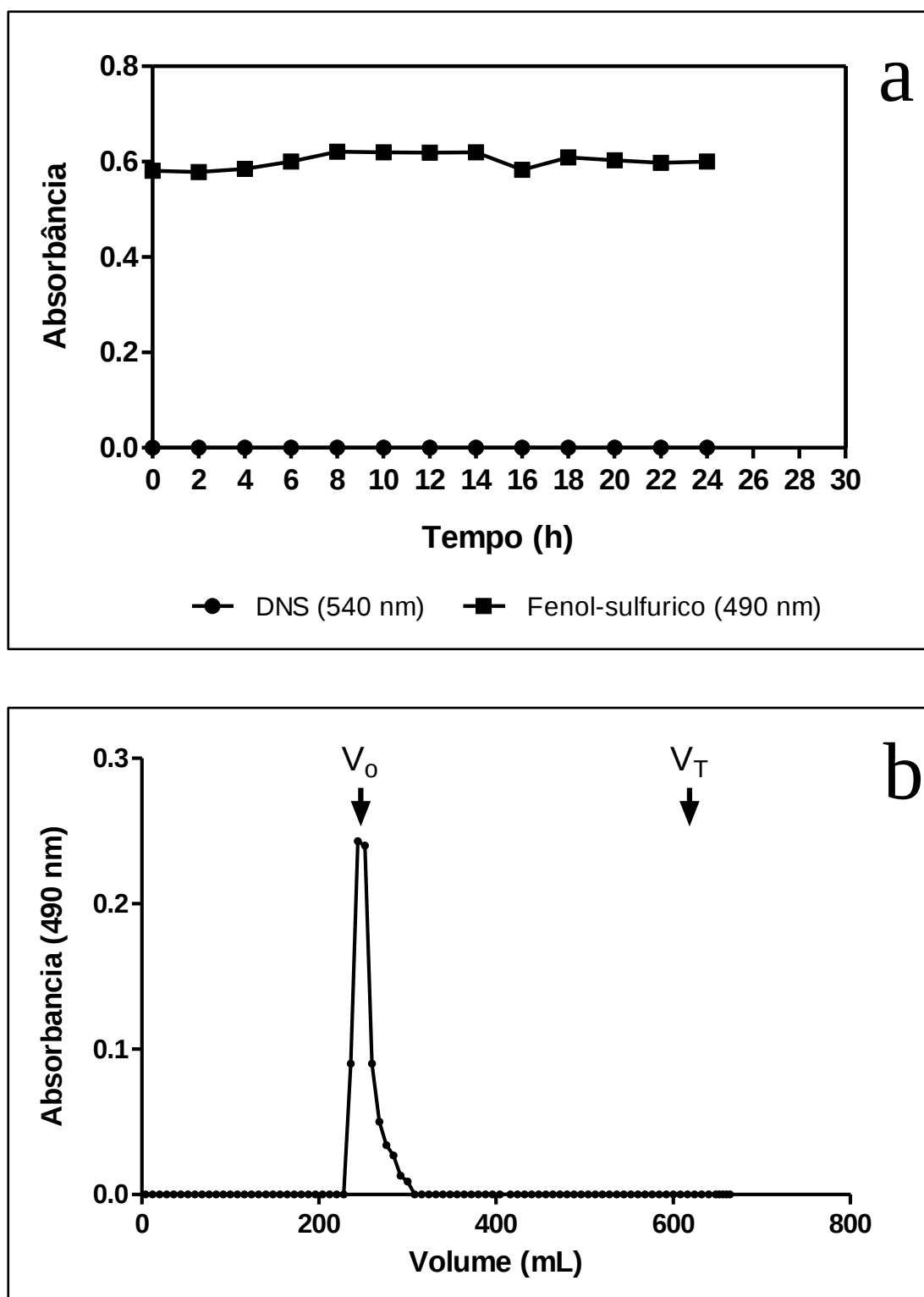


Figura 31 – Cinética da hidrólise enzimática de FP nativa sob ação da enzima β -endo-1,4-D-mananase (a) e Cromatografia em coluna de Biogel P2 do hidrolisado obtido da FP, pela enzima β -endo-1,4-D-mananase (b).

Fonte: O autor.

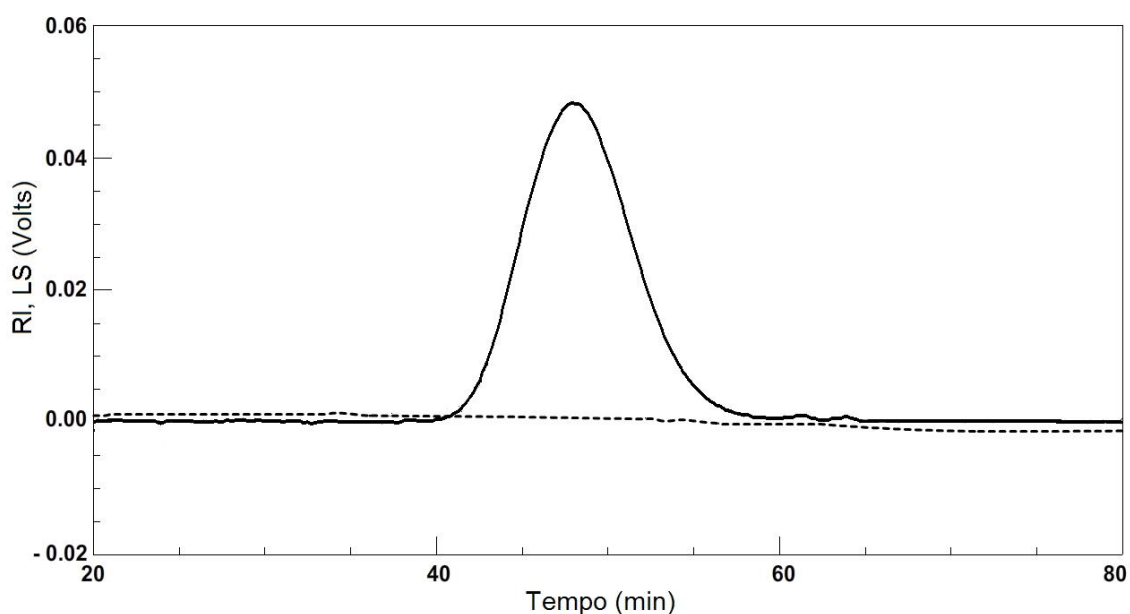


Figura 32 – Perfil de eluição da molécula MNR2, obtida da hidrólise enzimática de FP pela enzima β -endo-1,4-D-mananase. — RI, - - - MALLS.

Fonte: O autor.

Assim como o encontrado nas moléculas nativas, MNR2 é formado majoritariamente por manose e glucose, na idêntica proporção da encontrada em HP (Tabela 7). A variação é dada pela percentagem de acetil das amostras. Poder-se-ia supor que o processo de hidrólise colabora para a variabilidade percentual dos grupamentos acetil nas moléculas obtidas cujo grau de substituição (DS) correspondeu a 0,42.

Tabela 7 – Análises químicas de MNR2, obtida através da hidrólise com mananase de FP nativa

Amostra	Monossacarídeos (mol%) ^a				%	
	Man	Glc	AU ^b	Acetil	CHO ^c	PTN ^d
MNR2	92,0	5,0	3,0	10,0	61,0	tr ^e

^a analisados em GLC na forma de acetato de alditóis.

^b ácidos urônicos

^c CHO, carboidratos totais, ^d PTN, proteínas

^e valores inferiores a 1% foram considerados traço

Em um trabalho recente, Simões e colaboradores (2012), utilizando a mesma abordagem executada neste estudo, promoveram a hidrólise de uma amostra comercial de polissacarídeos de *A. barbadensis* que continha uma razão de 2,08 grupos acetil para cada unidade monossacarídica. Contrariamente ao encontrado, a amostra comercial não gerou uma única molécula, mas uma série de oligossacarídeos acetilados formados por unidades de hexoses e pentoses. A composição monossacarídica e análise de metilação demonstraram que a molécula possuía cadeias laterais de arabinose e mananas acetiladas. Entretanto, a molécula em estudo no presente trabalho, MNR2, não apresentou cadeias laterais ou unidades de pentoses em sua composição.

Com a finalidade de determinar a estrutura química fina desta fração, MNR2 foi submetida a estudos espectroscópicos de RMN (Figura 33).

Na RMN de ^{13}C (Figura 33b), o sinal de carbono anomérico em 100,1 ppm está em concordância com C-1 de Man α e o sinal em 98,4 ppm é definido como sinal de C-1 onde C-2 contém um substituinte, no caso, grupos acetil (TELEMAN et al., 2003; HANUKSELA, 2004).

A exemplo do encontrado na fração SP, na região de impressão digital do espectro de RMN de ^1H (Figura 33a), também foi possível assinalar os sinais atribuídos aos prótons anoméricos de $\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$, corroborando para identificação de mananas acetiladas e identificar os prótons de extremidades redutoras α (5,18 ppm) e β (4,89 ppm) (TELEMAN et al., 2003; HSIEH et al., 2008).

Os sinais em 60,5 ppm e 63,0 ppm correspondem a C-6 de Man α não substituído e com substituintes acetil, respectivamente. Os grupos acetil estão assinalados em 20,5; 20,2 e 19,9 ppm, referentes ao grupo $-\text{CH}_3$ em diferentes posições assim como o grupo C=O (Figura 33b – inserto), com deslocamentos químicos de 173,8; 173,2; 173,0; 172,6 e 172,4 ppm (WOZNIEWSKI, BLASCHEK, FRANZ, 1990).

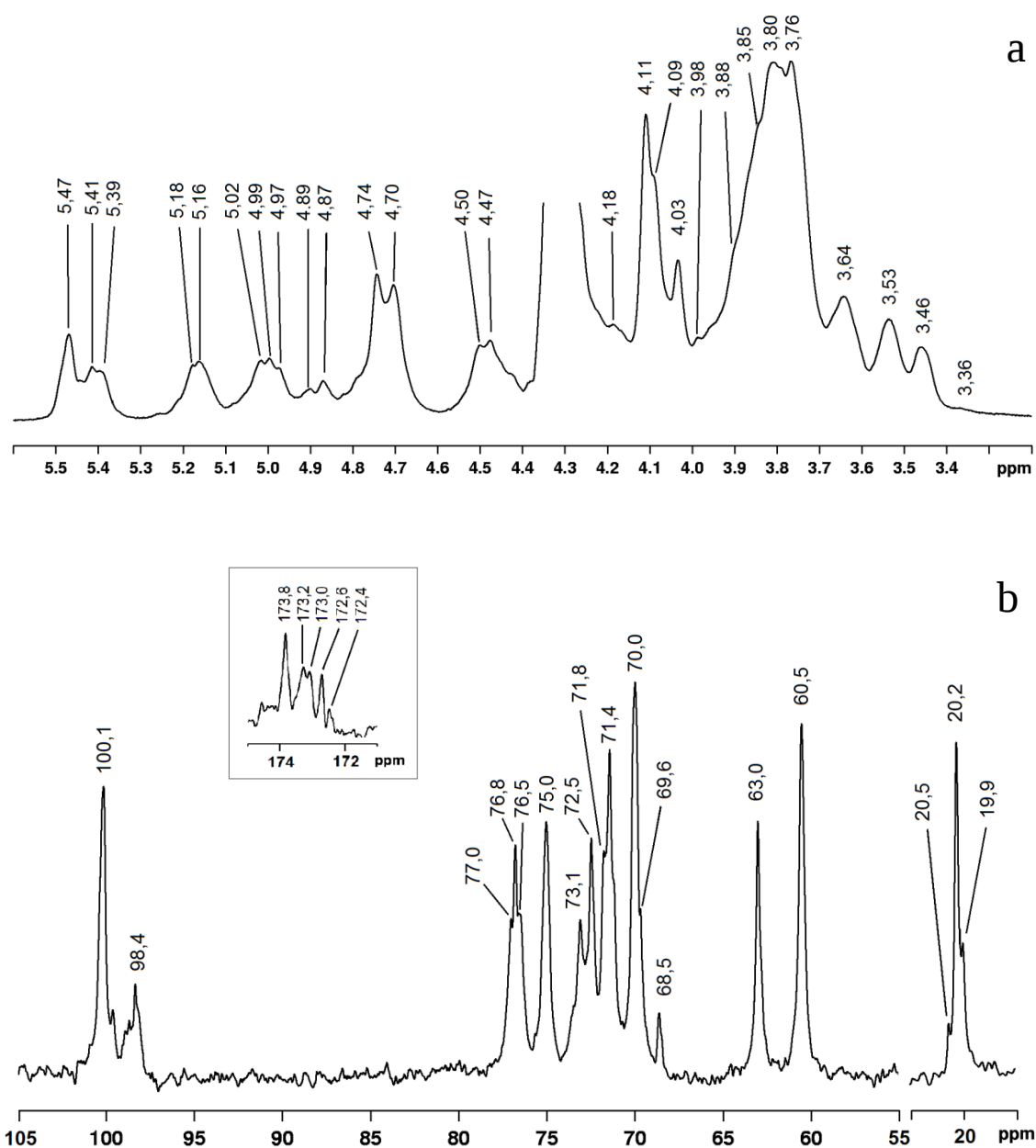


Figura 33 – Espectros de RMN de ^1H (a) e RMN de ^{13}C (b) da fração MNR2 obtida a partir da hidrólise com mananase de FP nativa. Os espectros foram adquiridos em D_2O a 65°C , usando acetona como padrão interno (2,22 e 30,2 ppm).

Fonte: O autor.

No espectro de HSQC, observamos as correlações entre os carbonos assinalados e os prótons (Figura 34).

Tal como o encontrado nas moléculas anteriores, as correlações são semelhantes, mostrando que a molécula é formada por manose 1→4 ligadas com conformação linear e altamente acetilada nas posições 2, 2/3, 3 e 6.

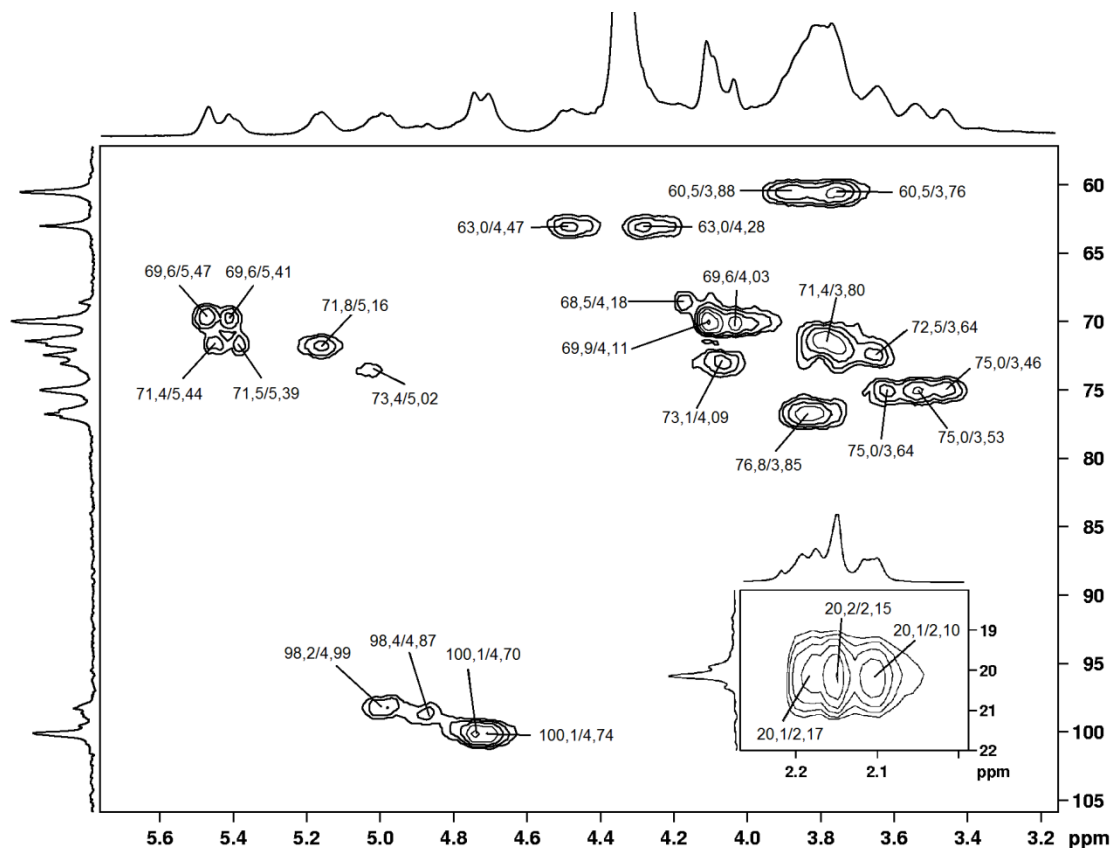


Figura 34 – Espectro de HSQC da molécula MNR2, obtido a 65 °C em D₂O.

Fonte: O autor

A tabela 8 apresenta os deslocamentos químicos encontrados no experimento de HSQC.

Tabela 8 – Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H da fração MNR2 obtida através da hidrólise enzimática de FP

Unidades ^a	Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C e ¹ H (ppm) ^b											
	C-1		C-2		C-3		C-4		C-5		C-6	
	H-1		H-2		H-3		H-4		H-5		H-6a, b	
M	100,1		70,0		72,5		76,8	75,0	75,0	75,0	60,5	60,5
	4,74		4,11		3,64		3,85	3,64	3,53	3,46	3,76	3,88
M2Ac	98,4		71,5	71,5	69,6		76,8	75,0	75,0	75,0	63,0	63,0
	4,87		5,44	5,39	4,03		3,85	3,64	3,53	3,46	4,28	4,47
M2,3Ac	98,2		69,6	69,6	71,8		73,1	75,0	75,0	75,0	60,5	60,5
	4,99		5,47	5,41	5,16		4,09	3,64	3,53	3,46	3,76	3,88
M3Ac	100,0		68,5		73,4		73,1					
	4,70		4,18		5,02		4,09					
M6Ac									71,4		63,0	63,0
									3,80		4,28	4,47

^a A designação usada: M red, Manose não acetilada em terminais redutores; M, Manose não acetilada; M2Ac, manose 2-O-acetilada; M2,3Ac, manose 2,3-O-acetilada; M3Ac, manose 3-O-acetilada; M6Ac, manose 6-O-acetilada.

^b Relativo ao padrão interno – acetona 30,2 e 2,224 ppm (D₂O, 65°C, adquirido a 400 MHz)

5.5.4. Hidrólise enzimática parcial de FP desacetilada com β -endo-1,4-D-mananase

A fim de comparar os tratamentos efetuados com a glucanase, na molécula FP desacetilada, foi realizado o mesmo experimento com uma mananase (β -endo-1,4-D-mananase) (Figura 35a).

Durante o tempo decorrido do experimento, detectou-se a presença de oligossacarídeos a partir das 6 h, indicando que a reação de hidrólise do mesmo substrato pela mananase é mais lenta do que para a glucanase. A reação somente apresentou um platô de estabilidade a partir da 16^a h, permanecendo assim até o fim do experimento. Diante disso, determinou-se que a reação seria levada à termo por um tempo de 24 h.

Após o tempo de reação e posterior filtração, obteve-se um material retido no filtro, cujo rendimento em relação a FP inicial foi de 23%, demonstrando que uma parte significativa da amostra não foi hidrolisada pela enzima. Apresentando a β -endo-1,4-D-mananase de um grau de pureza maior, seria esperado um maior consumo de substrato e portanto mais velocidade na geração de oligossacarídeos detectáveis.

Da mesma forma como foi realizado para os hidrolisados anteriormente apresentados, utilizou-se cromatografia de exclusão em BioGel P2 para avaliar a formação dos produtos do tratamento com a mananase. O resultado da cromatografia pode ser observado na figura 35b.

Foram obtidos 5 picos, identificados pelos números de 1 a 5. O pico 1, de menor intensidade, foi eluído no volume morto da coluna e implica em um composto de maior massa molar, excluído em BioGel P2. Tal como encontrado para a enzima β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase.

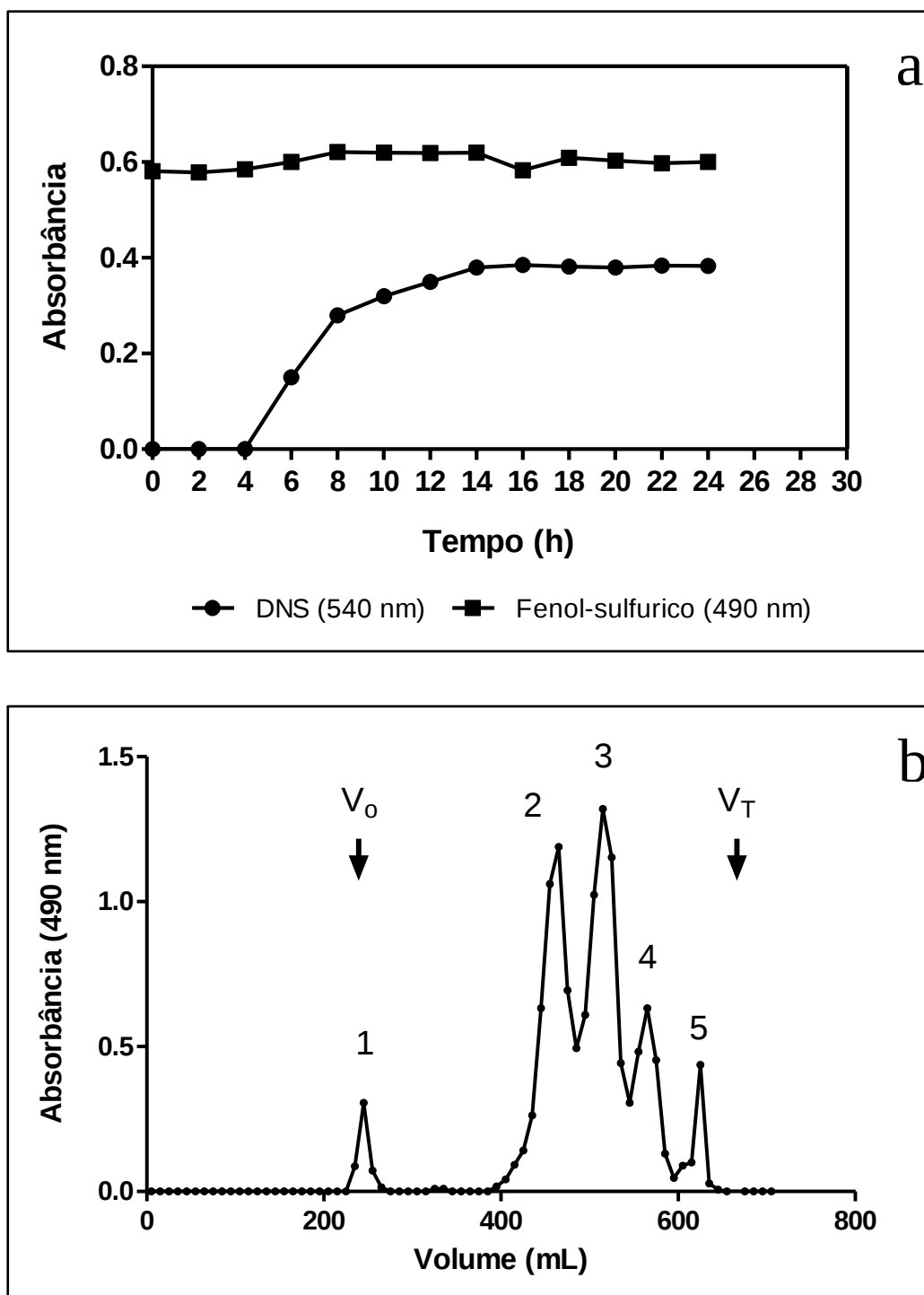


Figura 35 – Cinética da hidrólise enzimática de FP desacetilada sob ação da enzima β -endo-1,4-D-mananase (a) e cromatografia em coluna de BioGel P2 do hidrolisado obtido da FP desacetilada, pela enzima β -endo-1,4-D-mananase (b).

Fonte: O autor.

Seguindo o procedimento executado nos hidrolisados enzimáticos anteriores, para a análise dos produtos de hidrólise, foi realizada uma cromatografia em camada delgada dos picos obtidos da cromatografia em coluna (Figura 36). As frações encontradas foram comparadas com os padrões monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos.

O cromatograma apresentou para os picos 4 e 5, uma banda única, indicando majoritariamente que um composto foi isolado.

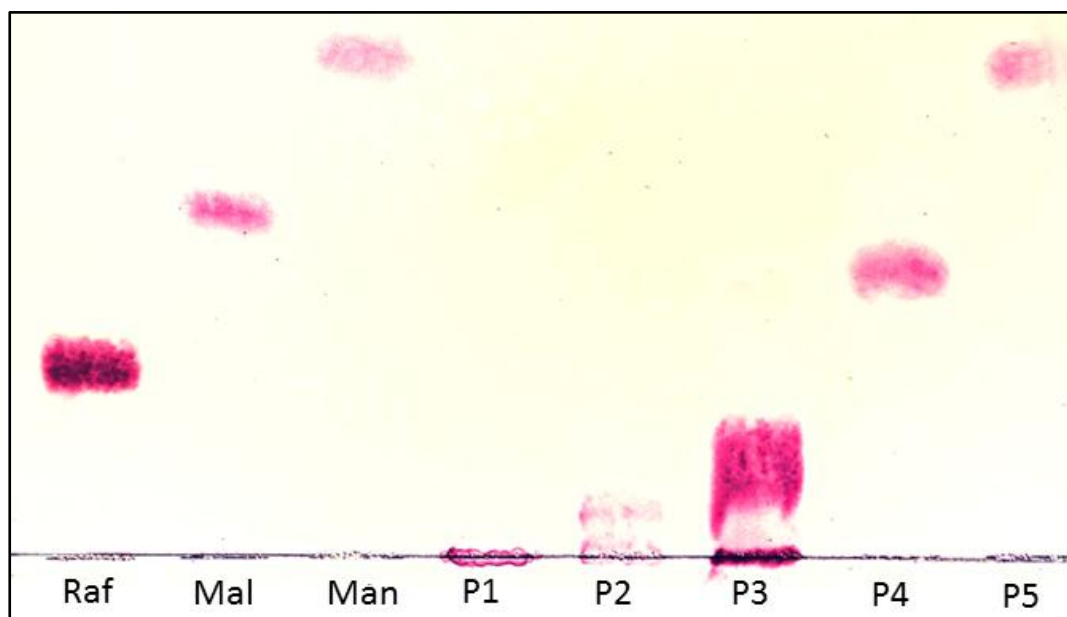


Figura 36 – Cromatografia em camada delgada dos compostos isolados da FP pela cromatografia em coluna (CC), hidrolisada com a enzima β -endo-1,4-D-mananase. Raf, rafinose; Mal, maltose; Man, manose. P1 a P5, picos da CC.

Fonte: O autor.

É possível inferir que o pico 5 é constituído pelo monossacarídeo manose. O pico 1 não deslocou-se na CCD, evidenciando sua elevada massa molar, de acordo com seu comportamento na cromatografia de exclusão.

Os picos 2 a 4 foram analisados através de espectrometria de massas (Figura 37).

As análises revelaram as presenças de um tetrassacarídeo (pico 2), um trissacarídeo (pico 3) e um dissacarídeo (pico 4). As relação m/z para o pico 2

apresentaram dois íons m/z 689 $[M+Na]^+$ e 705 $[M+K]^+$. O pico 3 apresentou como íon molecular m/z 527 $[M+Na]^+$ e o pico 4 m/z 365 $[M+Na]^+$.

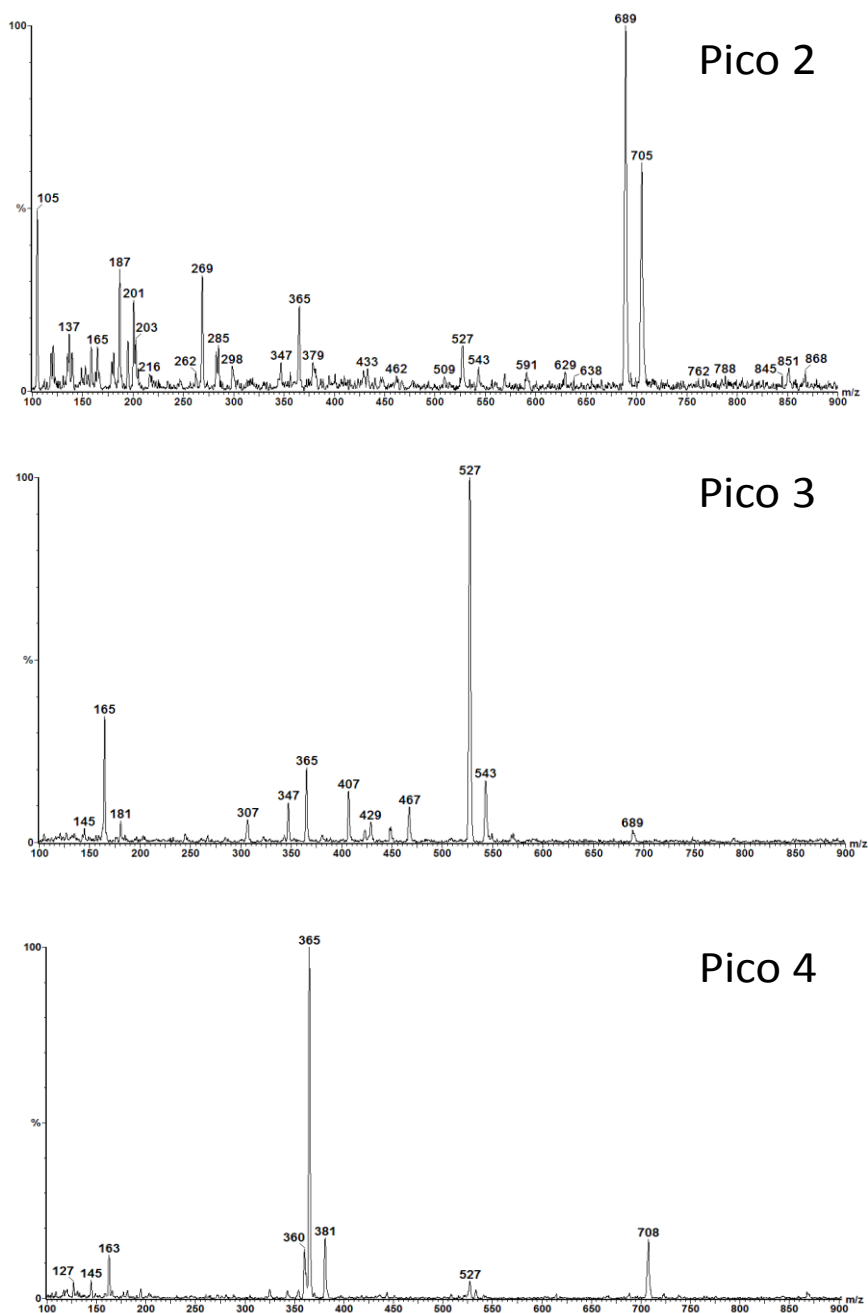


Figura 37 – ESI-MS dos compostos obtidos FP desacetilada, através da hidrólise com β -endo-1,4-D-mananase. Os espectros de massas estão assinalados de acordo com os picos obtidos na cromatografia em coluna.

Fonte: O autor.

Utilizando como modelo de hidrólise enzimática um polissacarídeo desacetilado obtido de *A. vera*, Chow e colaboradores (2005) obtiveram igualmente um conjunto de 4 picos em cromatografia sem, no entanto, identificar os oligossacarídeos encontrados. Em galactomananas de caroba submetidas a tratamento com a enzima β -D-mananase em condições semelhantes ao nosso estudo, produziram oligômeros com unidades variáveis entre Dp 2 a 9 (McCLEARY, MATHESSEN, 1983).

A tabela 9 apresenta a comparação entre os tratamentos efetuados com as enzimas.

Tabela 9 – Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos da FP nativa e FP desacetilada.

	β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase	β -endo-1,4-D-mananase
FP nativa		
Rendimento do retido (%)	6,5	6,5
Rend. dos oligossacarídeos (%)	80	85
Produtos de hidrólise		
Excluído em BioGel P2	SP (3,88 kDa)	MNR2 (191,6 kDa)
Incluído em BioGel P2	Hex ₄ Ac ₄₋₅ ; Hex ₅ Ac ₃₋₆ ; Hex ₆ Ac ₃₋₇ ; Hex ₇ Ac ₄₋₈ ; Hex ₈ Ac ₅₋₉ ; Hex ₉ Ac ₆₋₉ .	–
FP desacetilada		
Rendimento do retido (%)	72	23
Rend. dos oligossacarídeos (%)	12	20
Produtos de hidrólise		
Excluído em BioGel P2	–	Pico 1
Incluído em BioGel P2	Hex ₃ , Hex ₂ , Hex	Hex ₄ , Hex ₃ , Hex ₂ , Hex

A análise dos dados em conjunto mostrou que os tratamentos com β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase e β -endo-1,4-D-mananase na FP nativa apresentaram o maior rendimento em relação à FP desacetilada. Em

tratamento enzimático com a FP desacetilada, os produtos gerados foram majoritariamente aqueles não hidrolisados pelas enzimas, assim como, os oligos gerados foram hexoses com 1 a 4 unidades monossacarídicas e também monossacarídeos. Estes resultados sugerem que o tamanho limite para os oligossacarídeos gerados pela β -endo-1,4(1,3)-D-glucanase são mono, di e trissacarídeos enquanto que para a β -1,4-D-mananase, este limite estende-se a tetrassacarídeos

É possível sugerir também, que FP apresente em sua estrutura, unidades de Man não acetiladas que seriam pontos de ataque das enzimas, uma vez que a razão Man:Glc e a presença de grupamentos acetil podem impedir a ação das enzimas. Este impedimento estérico, representados principalmente pelo grupamento acetil, faz com que na FP nativa, haja frações de maiores massas moleculares.

5.6. Análise reológica

5.6.1. Análise do comportamento de fluxo de EA e FP

Conjuntamente com o estudo da estrutura química da glucomanana acetilada encontrada em *A. barbadensis* um estudo comparativo foi realizado com EA e FP, a fim de compreender como a composição e estrutura afeta seu comportamento físico-químico e reológico. As amostras analisadas foram escolhidas por corresponderem ao que efetivamente é utilizado nos processos industriais e também por seus rendimentos, em relação ao parênquima de reserva.

Para as amostras em estudo, os valores de G' e G'' foram determinados em uma frequência fixa 1 Hz. A faixa viscoelástica testada foi de 0,1 a 100 Pa de tensão, sendo os ensaios oscilatórios de frequência foram realizados a 1 Pa.

As curvas de fluxo (tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento) e de viscosidade (viscosidade aparente x taxa de cisalhamento), determinadas para as amostras EA e FP são apresentadas na figura 38.

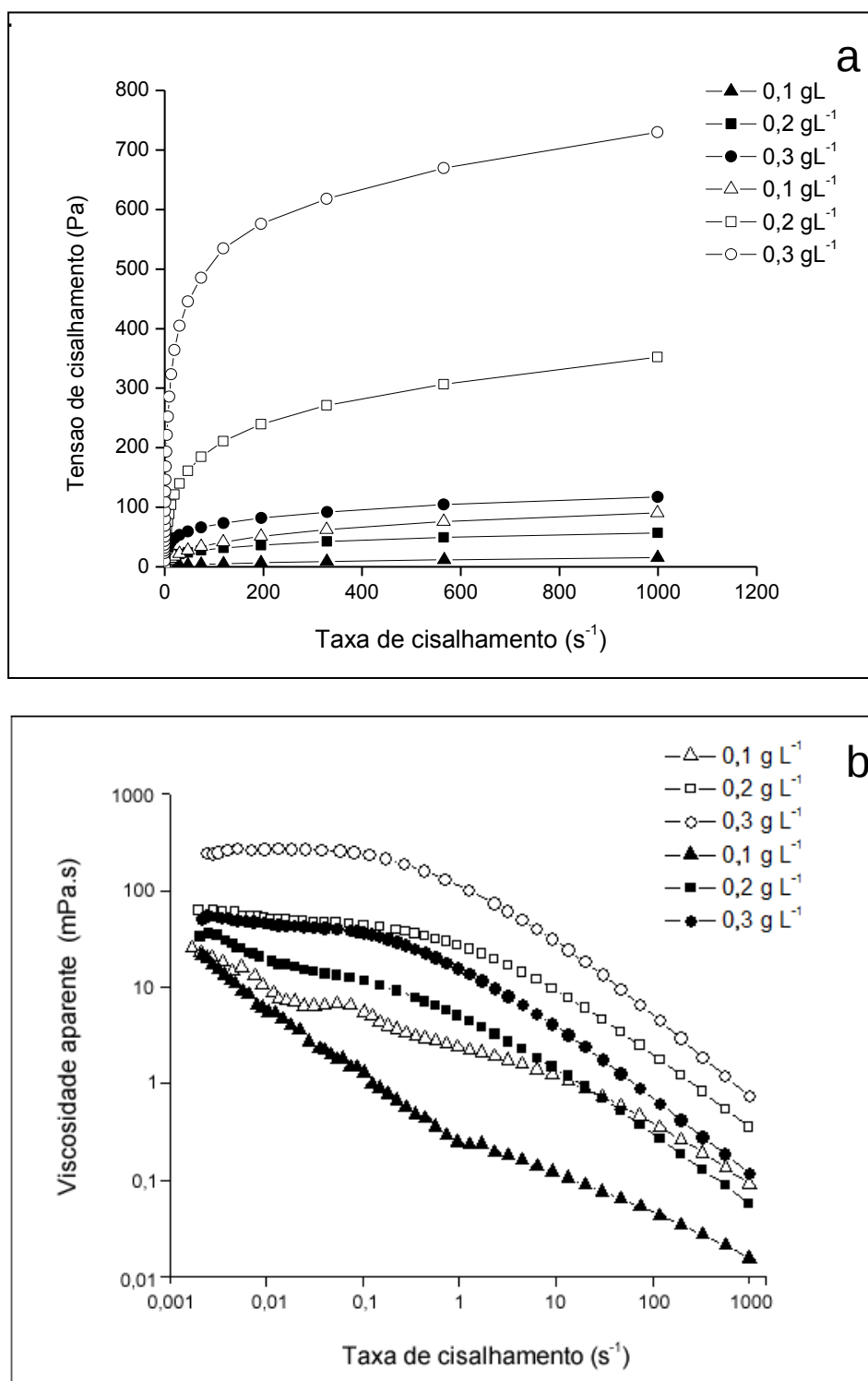


Figura 38 – Curva de fluxo (a) e curva de viscosidade aparente (b) como função da taxa de cisalhamento para as amostras de EA (▲ ■ ●) e FP (△ □ ○) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 g L⁻¹. As análises foram realizadas a 25 °C utilizando um sensor pp35-Ti.

Fonte: O autor.

O perfil apresentado no reograma permite estabelecer que as amostras em estudo possuem comportamento de fluxo de líquidos não-Newtoniano. As maiores tensões de cisalhamento foram observadas para as concentrações da amostra FP. Para a amostra EA, as tensões de cisalhamento não ultrapassaram 100 Pa, indicando uma diminuição da viscosidade (MILLS, KOKINI, 1984;. MILAS, RINAUDO, TINLAND, 1985; VRIESMANN, SILVEIRA, PETKOWICZ, 2009; SIMAS-TOSIN et al., 2010). As propriedades reológicas de glucomananas de origem vegetal ainda estão em estudo (ALONSO-SANDE et al., 2009; ALVAREZ-MACEÑIDO, MARIANA, MARTÍNEZ-PACHECO, 2008; DU et al., 2012; NISHINARI, ZHANG, 2004; WILLIAMS et al, 2010; YIN et al., 2008).

Existem alguns parâmetros que afetam o comportamento reológico das glucomananas, como o grau de acetilação, massa molar, temperatura e concentração de polímero. A geleificação é favorecida quando a massa molar e a concentração aumentar e o grau de acetilação diminuir (ALONSO-SANDE et al., 2009;. DU et al, 2012;. HUANG et al., 2002).

As soluções aquosas de EA e FP (0,1, 0,2 e 0,3 g L⁻¹) foram comparadas através de suas curvas de fluxo. Para ambas as frações, um comportamento não-newtoniano e pseudoplastico foi encontrado, conforme relatado anteriormente para polissacarídeos das folhas de *A. barbadensis* de plantas cultivadas no Chile (OPAZO-NAVARRETE et al., 2012), Califórnia-EUA (NI et al., 2004) e Israel (YARON, 1993). FP apresentou uma viscosidade mais elevada do que EA em todas as concentrações testadas. A 0,01 s⁻¹ para a concentração de 0,3 g L⁻¹, FP possui uma viscosidade aparente de 300,0 mPa.s, enquanto EA apresentou um valor de 44,8 mPa.s (Figura 38b).

Em altas taxas de cisalhamento a viscosidade varia linearmente com a taxa de cisalhamento. Para FP, cuja composição é majoritariamente polissacarídica de massa molar elevada e, conseqüentemente, sujeitas a deformações maiores, suas soluções apresentam níveis mais elevados de pseudoplasticidade do que as de EA. Assim, comparando-se as mesmas concentrações de EA e FP a viscosidade é sempre maior para FP que para EA, em toda a faixa de estudo da taxa de cisalhamento. O comportamento de fluxo pseudoplástico pode ser explicado pela discriminação de estruturas moleculares devido às forças hidrodinâmicas geradas, de modo a aumentar o

alinhamento dos componentes moleculares (ASPARLAN, HAITA, 2002; RAO, TATTYAKUL, 1999).

A viscosidade aparente para ambas as frações mostraram-se dependentes da concentração. Sob estas condições de análise, as soluções de 0,2 e 0,3 g L⁻¹ revelaram a formação de um patamar newtoniano em baixas taxas de cisalhamento, o que não é observado para a concentração de 0,1 g L⁻¹. Para McClements (1999), as baixas taxas de cisalhamento não são o suficiente para quebrar os agregados moleculares e aumentar a taxa das forças de cisalhamento hidrodinâmica que faz com que haja a separação de agregados, diminuindo a viscosidade, bem como a proporcionalidade entre tensão e a taxa de cisalhamento, típico de um fluido não-newtoniano (IBARZ, BARBOSA-CANOVA, 1999).

Além da influência da massa molar na viscosidade, alguns autores (DU et al, 2012; OOSTERVELD et al., 2000; PIPPEN, McCREADY, OWENS, 1950; SENGKHAMPARN et al., 2010; VRIESMANN, AMBONI, PETKOWICZ, 2011) sugerem que o grau de acetilação de polissacarídeos também desempenha um papel importante neste parâmetro reológico, por promover ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Du et al. (2012) propuseram, por análise reológica da glucomanana de konjac acetilada, que o aumento do grau de acetilação da molécula fez com que as interações hidrofóbicas fossem enfraquecida, enquanto ligações de hidrogênio foram reforçadas com o aumento do grau de acetilação. A viscosidade mais elevada obtida para FP, que apresenta maior teor de acetil (18,4%), quando comparada com a de EA (9,2%), sugere a prioridade das ligações de hidrogênio e um atraso no processo de gelificação (HUANG et al., 2002).

A descrição do comportamento reológico dos materiais pode ser realizada através de modelos que relacionam como a tensão de cisalhamento varia com a taxa de deformação. Dentre os modelos usados para descrever o comportamento reológico de polímeros naturais e sintéticos, os modelos de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência), Herschel-Bulkley e Carreau-Yasuda foram testados para as amostras em estudo e estes proporcionaram um bom ajuste aos dados experimentais, porém os melhores parâmetros estatísticos de ajuste, mostrando maiores R² foram obtidos com o modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) (Tabela 10).

Os valores de K e n na concentração de 0,3 g L⁻¹, foram de 4,15 e 0,56 Pa.s para EA e 14,17 e 0,68 Pa.s para FP, respectivamente. O Índice de comportamento de fluxo (n) de ambas as amostras apresentaram valores menores do que um (n<1). No entanto, comparando-se os valores entre as amostras, podemos observar que para EA, os valores de n foram menores que os valores de FP.

Tabela 10 – Comparação para as diferentes concentrações das amostras EA e FP, obtida das folhas de *A. barbadensis*, no ensaio de comportamento de fluxo, de acordo com o modelo matemático de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência).

Sample	[g L ⁻¹]	K (Pa.s)	n	R ²
EA	0.1	1,46±0,05	0,422±0,005	0,993±0,001
	0.2	3,10±0,14	0,494±0,002	0,931±0,001
	0.3	4,15±0,18	0,563±0,011	0,947±0,001
FP	0.1	3,18±0,11	0,615±0,005	0,976±0,001
	0.2	7,86±0,15	0,670±0,003	0,966±0,012
	0.3	14,17±0,18	0,686±0,002	0,960±0,001

O coeficiente de consistência (K) foi maior do que um (K>1) para todas as concentrações testadas, confirmando o seu comportamento pseudoplástico (STEFFE, 1996). É observado também que os valores de K na concentração 0,3 g L⁻¹, para FP (14,17), foi dez vezes maior que para EA (4,15), evidenciando que a estrutura química das amostras apresentaram influência nos parâmetros estudados.

5.6.2. Comportamento viscoelástico de EA e FP

Com a finalidade de determinar a região viscoelástica linear, foram realizadas varreduras de tensão em diferentes frequências para as amostras EA e FP (Figura 39).

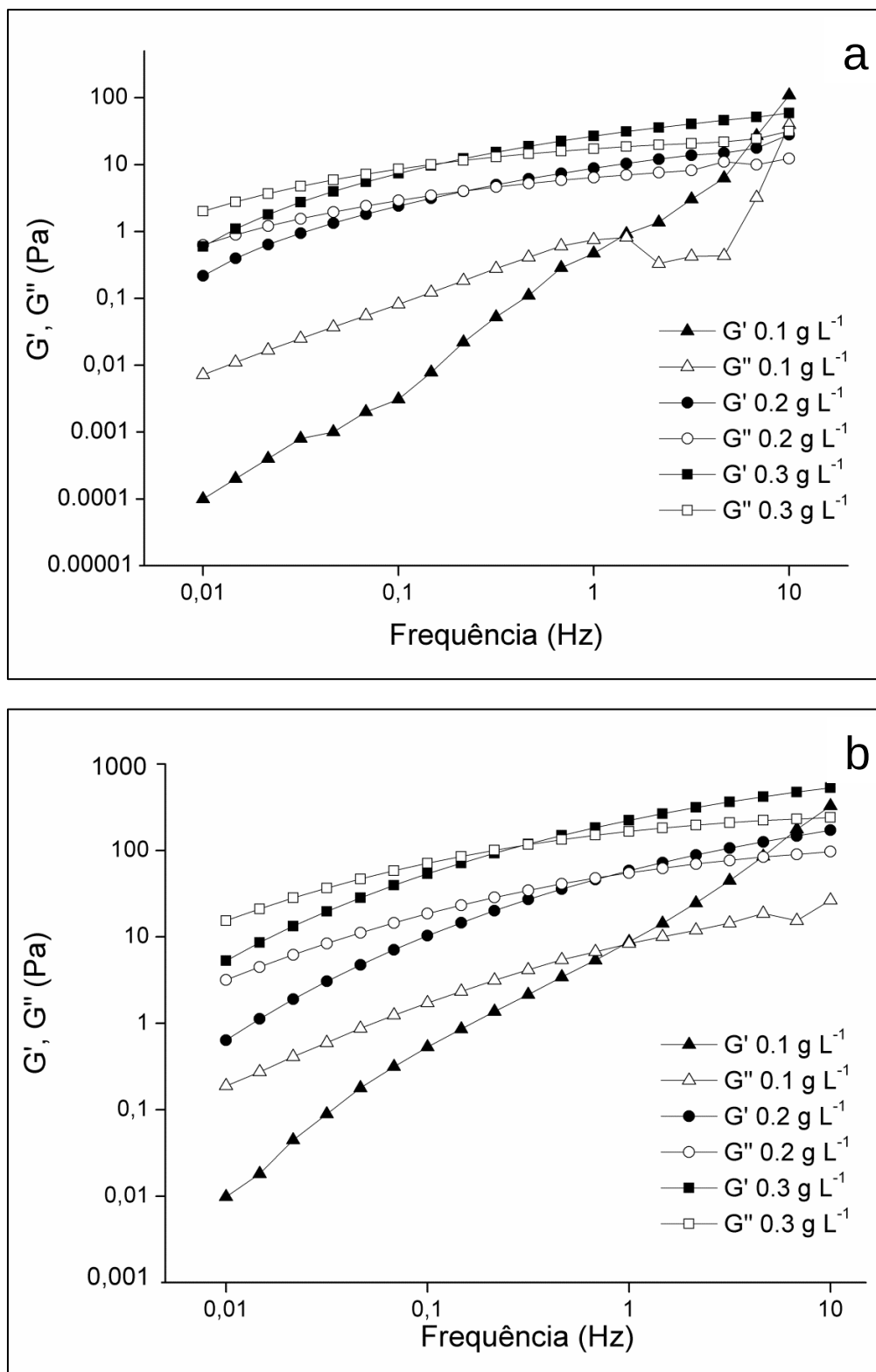


Figura 39 – Varredura de frequência a 25°C para as amostras de EA (a) e FP (b) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 g L⁻¹, com sensor pp35-Ti a 1 Pa de tensão.

Fonte: O autor.

Para as amostras em estudo, os valores de G' e G'' foram determinados em uma frequência fixa de 0,1, 1 e 10 Hz, sendo que a de 1 Hz foi a que apresentou melhor resposta linear.

O comportamento viscoelástico das frações EA e FP foi avaliado por análises oscilatórias dinâmicas (Figura 39). A finalidade deste experimento é obter informações a respeito do caráter sólido das amostras, através do módulo de armazenamento (G') e do caráter líquido, através do módulo de perda (G''). Na amostra EA em todas as concentrações, o valor de G'' excedeu a G' em baixas frequências.

Como mostrado na tabela 11, para todas as concentrações, os valores de G'' e G' se cruzaram em diferentes frequências. A frequência no qual este cruzamento aconteceu, diminuiu com o aumento da concentração. Este ponto de cruzamento indica a transição entre o caráter viscoso para caráter elástico das amostras. Logo, todas as amostras podem ser classificadas como viscoelásticas. Entre as amostras analisadas, observa-se que o caráter viscoelástico para a amostra na FP na concentração de 3 g L⁻¹, ($G'=G''$, 114,4 Pa) é dez vezes maior em relação a EA ($G' = G''$, 10,6 Pa).

Tabela 11 – Valores de inversão de G' e G'' para as amostras de EA e FP, obtidas de *Aloe barbadensis* Miller

Amostras	Concentração (g L ⁻¹)	$G'=G''$ (Pa) ^a	Frequência (Hz)
EA	0.1	0.8	1.4
	0.2	4.0	0.2
	0.3	10.6	0.2
FP	0.1	8.2	1.0
	0.2	51.0	0.8
	0.3	114.4	0.3

^aValores obtidos em frequências de 0,01 a 100 Hz e 1 Pa de tensão

Estes dados são concordantes com os resultados dos experimentos realizados em análises estáticas a partir do comportamento de fluxo.

5.6.3. Ensaio de fluência e recuperação

O teste de fluência e recuperação é muitas vezes utilizado para avaliar as características viscoelásticas da possível estrutura interna de um sistema, e as mudanças associadas com a adição de novos ingredientes em um sistema, além de fornecer informações sobre a textura de polímeros (DOLZ, HERNANDEZ, DELEGIDO, 2008)

A figura 40 apresenta o ensaio de fluência e a resposta de recuperação a partir de soluções aquosas de EA e FP, para uma tensão aplicada de 3 Pa.

A compliança J ($J = \gamma/\tau$) reflete a facilidade com que um material é deformado, sendo que quanto maior o valor de J , menor é a resistência oferecida pelo material à deformação. Na fase inicial (arraste) não é observado curva de caráter elástico como se denota em materiais que possuam tal característica, nos 300s iniciais do experimento.

As amostras apresentam, portanto, uma característica de um fluido viscoelástico com recuperação de deformação atingindo valores de compliança (J) constante e diferente de zero, ao final dos 300s da fase de recuperação. As amostras de EA e FP em concentrações de 0,2 e 0,3 g L⁻¹ apresentaram caráter menos líquido do que o observado para a concentração de 0,1 g L⁻¹.

Entretanto, FP na concentração de 0,3 g L⁻¹ exibiu o menor caráter fluído dentre todas as concentrações das amostras em estudo, com valores de compliança (J) de 250 Pa⁻¹, quando comparado com a amostra EA na concentração 0,3 g L⁻¹ que apresentou compliança (J) de 2300 Pa⁻¹. Quando comparado com os resultados encontrados na análise do comportamento de fluxo (Figura 38), obteve-se resultados consistentes onde a concentração de FP para 0,3 g L⁻¹ apresentou também a maior viscosidade aparente.

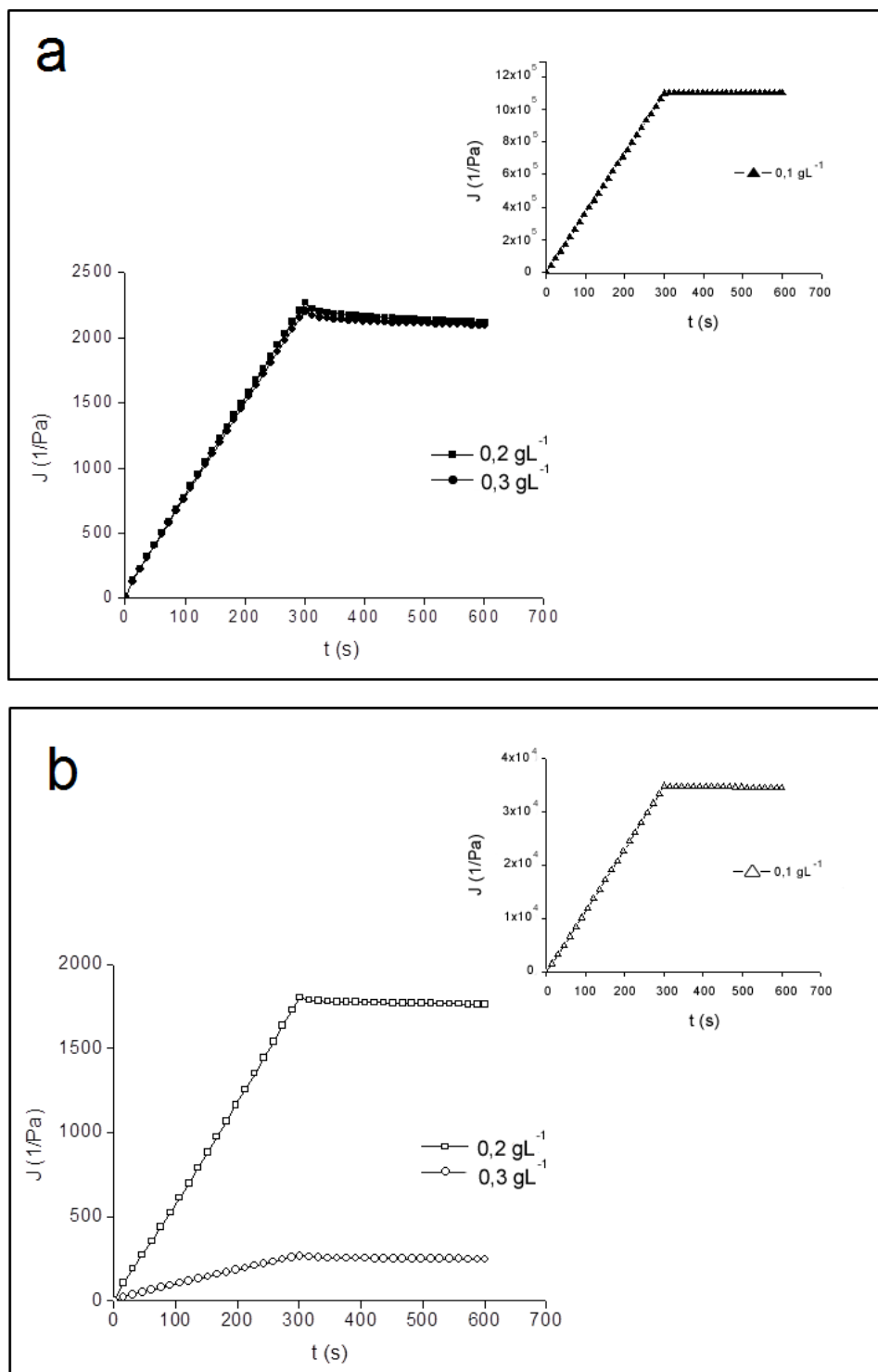


Figura 40 – Ensaio de fluência e recuperação para as amostras de (a) EA ($\blacktriangle$ $\blacksquare$ $\bullet$) e (b) FP ($\triangle$ $\square$ $\circ$) a concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 g L^{-1} , respectivamente, mensurados a 3 Pa de tensão, a 25 °C, utilizando um sensor pp35-Ti

Fonte: O autor.

Apesar de apresentar uma ausência de comportamento elástico, descrito pelas análises dinâmicas oscilatórias e reforçadas pelos ensaios de arraste e recuperação pode-se inferir que concentrações mais altas de EA e FP apresentariam maior comportamento elástico. Porém, em concentrações superiores a $0,3 \text{ g L}^{-1}$ usando $0,5 \text{ Pa}$ de estresse no experimento, o comportamento das amostras foi semelhante à $0,3 \text{ g L}^{-1}$ a 3 Pa , indicando que o aumento da concentração tem pouca influência sobre o aumento da elasticidade como observado em gráficos de géis verdadeiros em ensaios de arraste e recuperação. Ainda, as análises de comportamento de fluxo e de viscosidade, demonstraram que na maior concentração das amostras, estas apresentaram um comportamento mais viscoso em baixas taxas de cisalhamento.

Uma vez obtidas e caracterizadas quimicamente e reologicamente, as espécies químicas com maior rendimento foram testadas em ensaios biológicos a fim de verificar suas atividades. O primeiro modelo testado foi o efeito de EA, FP, HP e das frações SP e MNR2 sobre a atividade antioxidante.

5.7. Efeito das amostras nas atividades antioxidantes

5.7.1. Efeito das amostras na captação do radical DPPH

O efeito da captação do radical DPPH pelo EA, FP, HP e dos hidrolisados enzimáticos são mostrados na figura 41.

A amostra EA apresentou efeito sobre a a captação de radical DPPH nas percentagens de 45 a 48%, para as concentrações estudadas. As demais amostras apresentaram diferenças significativas entre as concentrações. A atividade antioxidante para estas amostras foram dose-dependentes, ou seja, quanto maior a concentração, maior a percentagem de inibição. A amostra FP foi a que apresentou maior atividade dentre as frações (FP, HP, MNR2 e SP), quando comparadas as concentrações entre si. Esta fração apresentou em sua maior concentração ($800 \mu\text{g mL}^{-1}$) 30,4%.

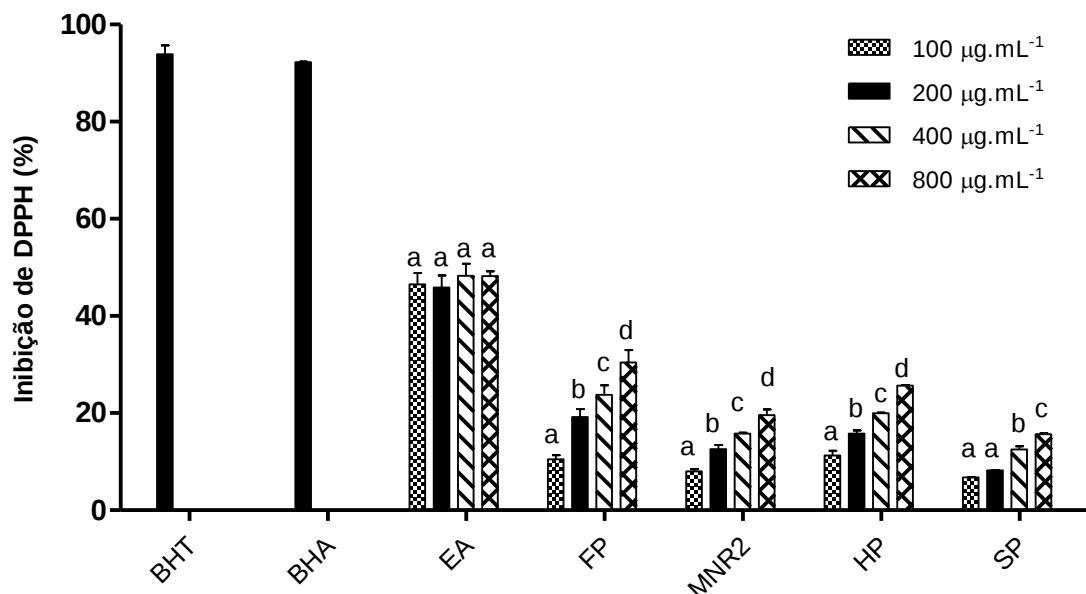


Figura 41 – Atividade sequestradora do radical DPPH.

Nota: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, em concentrações que variam de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Letras diferentes entre os valores do mesmo grupo, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a $p < 0,05$, tendo como referência a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. BHT e BHA foram utilizados como padrões na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O autor.

5.7.2. Efeito das amostras sobre a atividade de poder redutor

A figura 42 mostra os resultados de determinação do poder redutor das amostras estudadas. Neste ensaio, é medida a capacidade das amostras em doar elétrons ao Fe^{3+} para sua redução. O poder redutor foi medido pela doação direta de elétrons na redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. O produto foi visualizado pela adição de íons de Fe^{3+} livre após a reação de redução, pela formação de uma coloração azul intensa, do complexo $\text{Fe}_4[\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6]_3$ e quantificado pela absorbância a 700 nm. O aumento da absorbância na mistura reacional indica aumento do poder redutor.

Os resultados encontrados denotam a capacidade das amostras em doar elétrons ao sistema para a redução do complexo de ferro. As amostras de

padrão de BHA com absorvância de aproximadamente 0,8 foi o referencial adotado, uma vez que o BHT não foi eficiente neste ensaio. A partir disso, observa-se que a amostra EA apresentou um patamar de 0,4 de absorvância na concentração de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$. Semelhante a ele, FP apresentou 0,36, HP 0,32 e MNR2 0,33 para as mesmas concentrações.

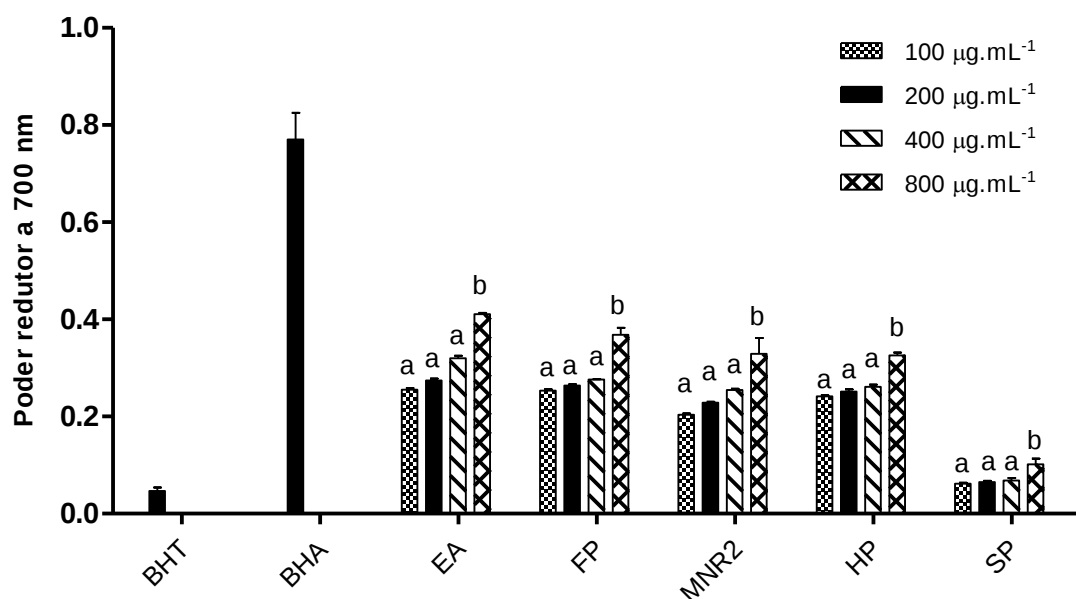


Figura 42 – Avaliação do poder redutor das amostras.

Nota: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, em concentrações que variam de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Letras diferentes entre os valores do mesmo grupo, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a $p < 0,05$, tendo como referência a concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. BHT e BHA foram utilizados como padrões na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O autor.

Neste ensaio, a fração SP apresentou absorvâncias muito inferiores aos seus pares, não ultrapassando 0,1 de absorvância em $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrando sua baixa capacidade de doação de elétrons ao sistema. É sugerido que esta fração tenha menor eficiência na doação de elétrons. Esta fração possui uma massa molar de 3,88 kDa e 15% de grupos acetil, o que implica em um alto grau de substituição. Quando grupos OH são substituídos por

outros grupos, a atividade antioxidante é afetada, uma vez que a capacidade de doar o próton deste grupamento é diminuída (ZHANG, JIN, SHI, 2008).

5.7.3. Atividade de inativação do ânion superóxido

A atividade das amostras em captarem o ânion superóxido é mostrada na figura 43. A amostra EA foi a que expressou o maior valor de atividade em relação as demais, e variou de 35,0 a 47,0% para a menor e para a maior concentração, respectivamente.

As amostras FP, HP, MNR2 e SP exibiram uma atividade percentual abaixo de 30%, que foi o patamar máximo atingido para a concentração de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo atribuído a essas amostras uma baixa atividade de captação de radicais superóxido.

A análise estatística dos grupos em suas concentrações demonstra que as concentrações de EA e SP apresentaram diferença entre todas as concentrações testadas. As amostras FP e MNR2, apresentaram diferenças somente para a concentração de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A amostra HP não apresentou diferença entre as concentrações testadas.

Excetuando-se as amostras EA e FP, as demais mostram decréscimo de atividade na concentração de 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O principal interesse em descobrir substâncias capazes de inativar o $\text{O}_2^{\bullet -}$ é que este radical gera outras espécies reativas com elevada citotoxicidade. A dismutação do $\text{O}_2^{\bullet -}$ gera H_2O_2 , pouco reativo em níveis fisiológicos, mas que pode atravessar a membrana celular e isso é um fato importante, pois o ambiente extracelular possui poucos mecanismos de defesa antioxidante (SOUTHORN, 1988).

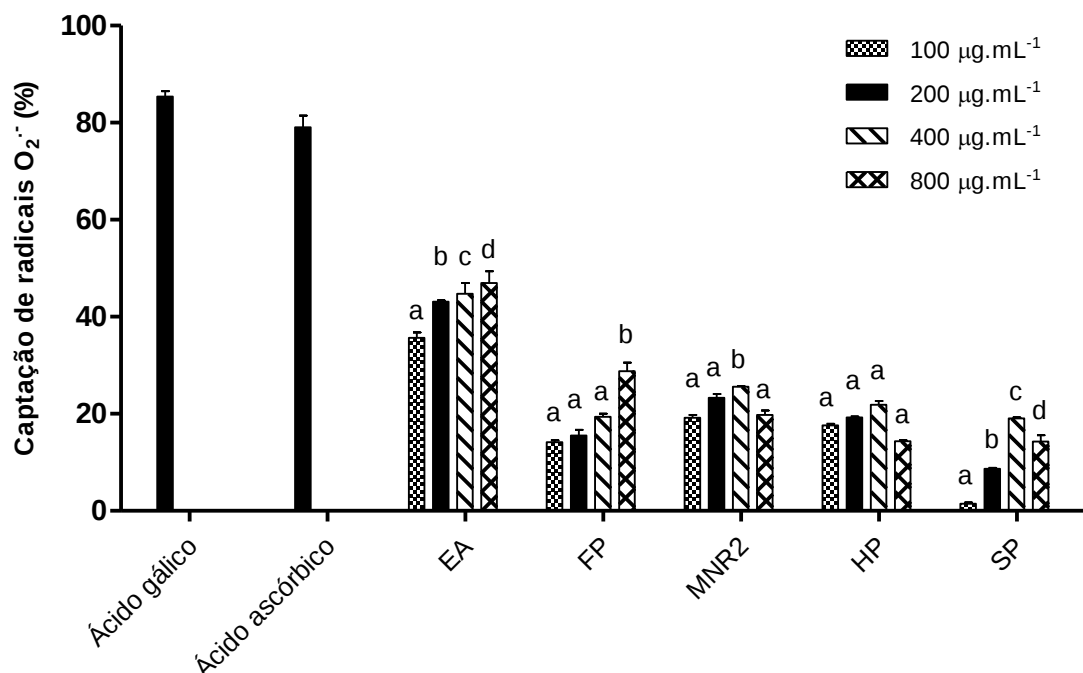


Figura 43 – Determinação da atividade de captação de radicais superóxido pelas amostras em comparação com a atividade dos padrões de ácido gálico e ácido ascórbico.

Nota: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, em concentrações que variam de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Letras diferentes entre os valores do mesmo grupo, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a $p < 0,05$, tendo como referência a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ácido gálico e ácido ascórbico foram utilizados como padrões na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O autor.

5.7.4. Efeito das amostras na captação de radicais hidroxila

Na figura 44 estão representados os resultados da atividade das amostras na captação de radicais $\cdot\text{OH}$. No sistema em estudo, foi gerado pela reação de Fenton. Neste método, o ácido salicílico captura $\cdot\text{OH}$ para formar o ácido 2,3-dihidroxibenzóico. Quando um captador de radicais livres está presente no meio reacional, ele compete com o ácido salicílico, fazendo com

que diminua a geração do ácido 2,3-dihidroxibenzóico e consequentemente diminua sua absorção. O radical $\cdot\text{OH}$ é uma das espécies mais reativas encontrada em meios biológicos, reagindo no próprio sítio ativo onde foi gerado, sendo responsável por grande parte dos danos celulares, causando danos ao DNA, proteínas e lipídeos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

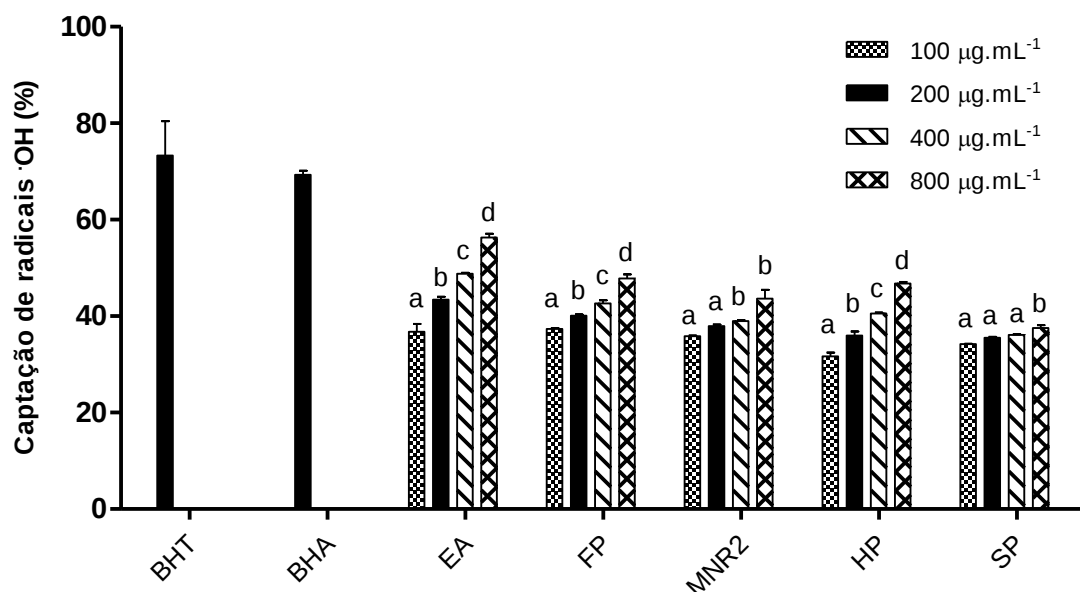


Figura 44 – Determinação da atividade de captação de radicais hidroxila pelas amostras.

Nota: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, em concentrações que variam de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Letras diferentes entre os valores do mesmo grupo, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a $p < 0,05$, tendo como referência a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. BHT e BHA foram utilizados como padrões na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O autor.

As frações testadas neste ensaio apresentaram um perfil semelhante entre elas, uma vez que a atividade de captação de radicais hidroxila aumentou com o aumento da concentração testada.

As amostras EA, FP e HP mostraram um efeito concentração-dependente, apresentando em sua maior concentração (800 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 56,3; 48

e 47%, respectivamente. Ao compararmos estes resultados com a amostra de referência – BHT ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), observamos uma diferença de 17, 25 e 26%, respectivamente.

A amostra MNR2 apresentou diferença significativa nas concentrações de 400 (39%) e $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ (43,6%). sendo que entre si, não apresentaram diferença. A amostra SP, apresentou diferença na concentração de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ (37,5%).

O potencial efeito sequestrador de radicais $\cdot\text{OH}$ apresentado pelas amostras em estudo pode ser de grande importância, devido à alta reatividade e toxicidade deste radical. Estes resultados alinham-se aos dados da literatura que indicam que polissacarídeos apresentam atividade sequestradora deste radical (WU et al., 2006). Substâncias capazes de sequestrar radicais $\cdot\text{OH}$ podem ser importantes na prevenção dos danos oxidativos gerados por este radical, em diversas doenças que envolvem o estresse oxidativo, como aterosclerose, diabetes mellitus, doenças neuro-degenerativas, entre outras.

Diferente de outros ensaios em que a massa molar e conteúdo de acetil das amostras parece ter influência sobre a atividade, neste ensaio, as massas moleculares não foram fatores fundamentais, uma vez que todas apresentaram uma atividade de captação de radicais $\cdot\text{OH}$ semelhante.

5.7.5. Captação de radicais óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)

Na figura 45, estão representados os resultados da atividade de captação do radical $\text{NO}\cdot$. É possível observar que a captação deste radical apresenta atividade igual ou superior aos padrões utilizados, para algumas amostras. EA apresentou, na maior concentração testada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), uma atividade de 60% semelhante a atividade do ácido ascórbico, um dos padrões antioxidantes testados. A maior concentração de EA testada ($800 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou uma atividade de 81%, sendo estatisticamente igual a verificada para o padrão de ácido gálico (77%).

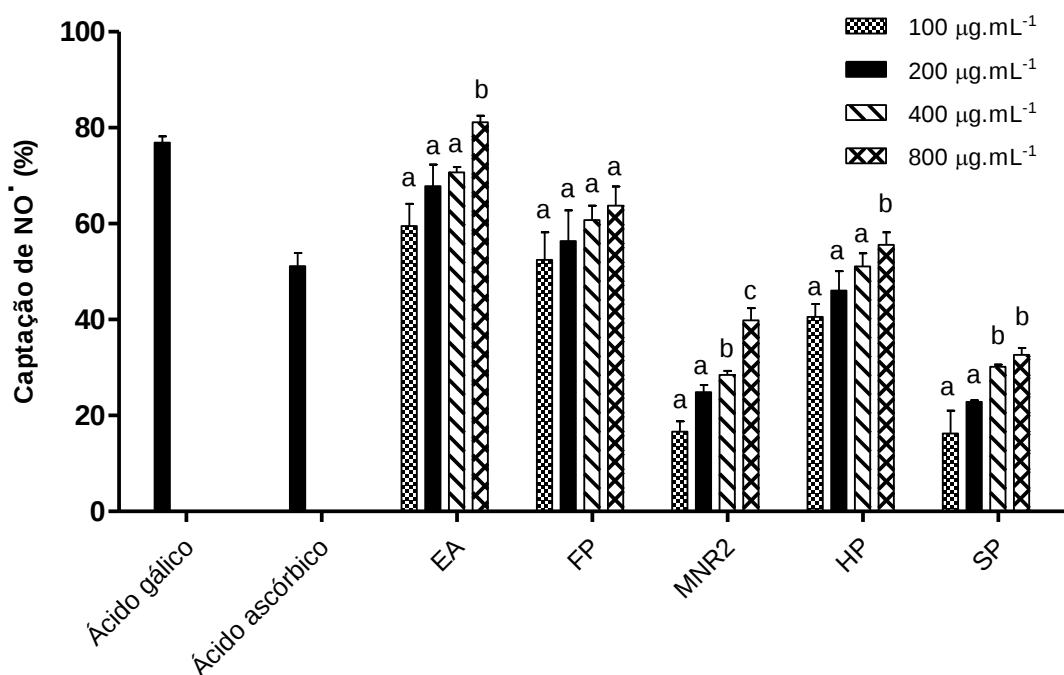


Figura 45 – Determinação da atividade de captação de radicais NO[•] pelas amostras.

Nota: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, em concentrações que variam de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Letras diferentes entre os valores do mesmo grupo, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a $p < 0,05$, tendo como referência a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ácido gálico e ácido ascórbico foram utilizados como padrões, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O autor.

As demais amostras também apresentaram atividade de captação do radical óxido nítrico. As amostras FP e HP, na maior concentração testada, foram superiores à atividade apresentada pelo ácido ascórbico. Já as amostras SP e MNR2 exibiram atividade entre 30 a 40% na concentração de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Isto permite inferir que também para esta atividade, a massa molar tenha afetado o desempenho frente ao ensaio.

5.7.6. Atividade sobre a quelação de Fe^{2+}

A capacidade de quelação de cátions divalentes como o Fe^{2+} foi avaliado pelo método da quelação de íons ferro utilizando ferrozine[®]. A figura 46 apresenta os percentuais de quelação do íon e sua comparação com as mesmas concentrações de EDTA, molécula utilizada como quelante de cátions divalentes.

É possível observar que as frações EA, FP e HP apresentaram atividade máxima de 25%, em relação ao padrão e as frações MNR2 e SP exibiram as menores atividades, não ultrapassando 10%, sendo que a amostra MNR2 foi a menos efetiva na atividade de quelação.

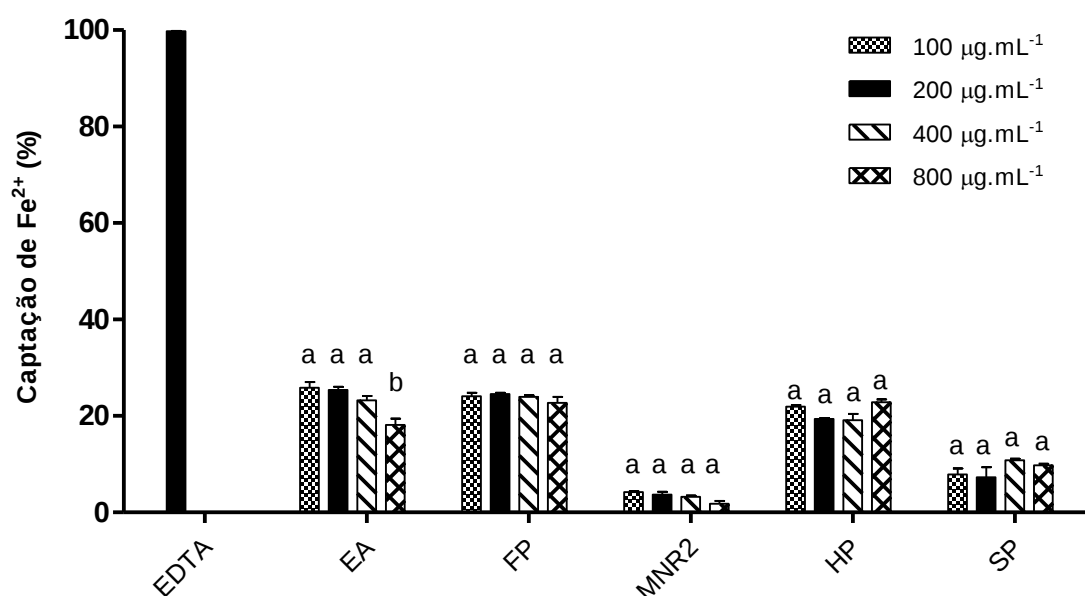


Figura 46 – Determinação da atividade de quelação de Fe^{2+} pelas amostras.

Nota: Cada barra representa média percentual $\pm$ EPM do poder redutor de 3 experimentos realizados em triplicata, em concentrações que variam de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Letras diferentes entre os valores do mesmo grupo, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a $p < 0,05$, tendo como referência a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. EDTA sódico foi utilizado como padrão, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: O autor.

Segundo a análise estatística somente a concentração de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ da amostra EA apresentou diferença entre as amostras estudadas, pela diminuição da percentagem em relação às concentrações de 100 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para as demais amostras, não houve diferença entre as concentrações estudadas.

Os complexos de ferro podem ser reduzidos pelo ascorbato, glutathione, cisteína e algumas redutases específicas. Em presença de ferro, pode ser produzido radicais superóxido através da reação de Fenton (PIERRE, MONTECAVE, 1999). Dessa forma, a presença de ferro livre nos sistemas biológicos faz com que sua disponibilização promova a geração de radicais livres em cascata. Os polissacarídeos, como os encontrados na babosa não oferecem uma forma de quelação de ferro, mesmo em altas concentrações.

Diversos trabalhos são realizados enfatizando as atividades antioxidantes de compostos naturais, principalmente no que tange a compostos polifenólicos (LIU, NG, 2000; PIETA, 2000; MARIUTTI, BRAGAGNOLO, 2007; ZHANG, JIN, SHI, 2008; CONFORTI et al., 2009; ZHANG, ZHANG, CHEUNG, 2009; SHARIFIFAR, DEHGHN-NUDEH, MIRTAJALDINI, 2009), que comprovadamente exibem atividades pronunciadas frente a muitos dos ensaios descritos neste trabalho.

Polissacarídeos e outros glicoconjugados podem apresentar muitas atividades biológicas, incluindo a antioxidante. Atualmente, atenção é dada a esta atividade, exibida por vários compostos encontrados em microorganismos e plantas, tais como os carboidratos, que cada vez mais se tornam importantes devido às aplicações nas indústrias farmacêuticas e de alimentos (CAPEK et al., 2009). Infusões de plantas são estudadas por suas atividades medicinais, nas quais estão presentes muitos compostos, dentre os quais, os polissacarídeos. Segundo Chen, Zhang e Xie (2005), a infusão de chá-verde contendo polissacarídeos, principalmente aqueles compostos por galactose e xilose, mostraram atividade antioxidante *in vitro*, pelos métodos de captação de radicais hidroxila e ânions superóxido, além de estimular a atividade da SOD.

Trabalhos recentes vêm demonstrando a atividade antioxidante de polissacarídeos de origem vegetal (CAPEK, MACHOVÁ, TURJAN, 2009; SIDDHURAJU, BECKER, 2007; CHEN et al., 2011), algal (YUAN, 2005; SOUZA et al., 2007) e também àqueles obtidos de fungos (LIU, OOI, CHANG,

1997; JIANG et al., 2005; LEE et al., 2007). Entretanto, em relação aos fungos, muitos autores realizam ensaios utilizando extratos hidro-alcóolicos, o que extrai além de uma fração polissacarídica, também compostos de natureza fenólica ou protéica (TURKOGLU et al., 2007; SHU, LUNG, 2008; SOARES et al., 2009; YOUGUO, ZONGLI, XIAOPING, 2009). Dessa forma, a atividade apresentada não pode ser atribuídas somente a polissacarídeos.

Especificamente em relação às atividades antioxidantes da espécie *A. barbadensis* poucos trabalhos estão disponíveis na literatura. A maior parte deles tem como foco principal o extrato etanólico obtido do parênquima de reserva que apresenta além de oligossacarídeos, uma concentração de compostos fenólicos, antraquinonas, cromonas, dihidrocumarinas, flavonóides, que quando testados apresentam uma resposta potente de atividade antioxidante (LEE, WEINTRAUB, YU, 2000; YEN, DUH, CHUANG, 2000; HU, XU, HU, 2003).

Kardošová e Machová (2006), estudando diversos polissacarídeos, dentre eles três frações polissacarídicas impuras de *Aloe*, obtiveram 28,2%, 20,15 e 38,0% de atividade em relação ao tocoferol utilizando o ensaio de peroxidação lipídica. Já em testes de com enzimas antioxidantes e polissacarídeos de *A. barbadensis*, no modelo de úlcera oral, animais tratados com polissacarídeos apresentaram maiores concentrações de SOD e malondialdeído séricas quando comparadas ao controle (YU et al., 2009).

Segundo Hu e colaboradores (2003), a atividade antioxidante de EA é bastante pronunciada, tal como a de captação de radicais livres, sendo semelhantes ao α -tocoferol e BHT. Do extrato de *A. barbadensis* var. chinensis, foi isolado um polissacarídeo denominado APS-1 que demonstrou ser um bom captador de radicais livres, inibidor da lipoperoxidação e protetor contra os radicais peróxido (WU et al., 2006). Da mesma forma, duas galactoglucomanas acetiladas (GAPS-1 e SAPS-1), obtidas de plantas de *A. barbadensis* irrigadas com água do mar também demonstraram atividades positivas nos ensaios de inibição de ânions superóxido, e moderadas na quelatação de ferro, inibição de radicais hidroxila, poder redutor e lipoperoxidação lipídica (CHUN-HUI et al., 2007).

Devido aos poucos dados disponíveis na literatura sobre a atividade antioxidante de compostos obtidos da *Aloe*, principalmente dos

polissacarídeos, este trabalho abre novas perspectivas acerca da utilização dessas substâncias nas indústrias cosmética e de alimentos, principalmente após a publicação do informe técnico da ANVISA nº 47 de 16.11.2011, que avaliou como não seguro alimentos à base de *Aloe*, uma vez que a proibição da comercialização deu-se justamente pela presença de contaminantes antraquinônico e pela falta de estudos subsidiem as decisões tomadas pelos órgãos de fiscalização. Sendo assim, maiores pesquisas neste sentido serão necessárias a fim de subsidiar as decisões das autoridades reguladoras acerca da eficácia e segurança destes produtos.

A atividade antioxidante dos polissacarídeos está relacionado com sua estrutura química. Estudos recentes relataram a atividade antioxidante exibida por polissacarídeos ácidos ou sulfatados, obtidos de vegetais superiores foram determinadas pela presença de grupos carboxila e sulfato (XIONG et al., 2011). Outras características como a massa molar afetam a capacidade de quelação de cátions divalentes (TSIAPALI et al., 2001). Já em outros casos, massas moleculares elevadas fizeram com que a atividade antioxidante aumentasse (SONG et al., 2010). Sugere-se que a capacidade de doação de prótons pelos polissacarídeos em alguns casos aumenta quando grupos substituintes localizam-se em C-2 e/ou C-3, fazendo com que o hidrogênio do carbono anomérico fique mais disponível para a doação e também, a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares fazem com que os prótons fiquem menos disponíveis para a reação (ZHANG, JIN, SHI, 2008). Assim, as atividades antioxidantes de polissacarídeos podem ser analisadas em função de múltiplos fatores combinados que ainda precisam ser melhor esclarecidas.

5.8. Ensaios de imunomodulação

5.8.1. Efeito das frações na viabilidade celular de macrófagos.

Para verificar o efeito das amostras sobre a viabilidade dos macrófagos, foi realizado o ensaio do MTT, nos tempos de 24 e 48 h, como mostrado na figura 47.

No tempo de 24 h (Figura 47a), a fração FP, nas concentrações de 40, 160 e 640 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram diminuição significativa na viabilidade celular dos macrófagos nas percentagens de 34,0; 44,8 e 50,8%, respectivamente. A

fração HP, apresentou declínio da viabilidade de modo significativo somente na concentração de $640 \mu\text{g mL}^{-1}$ na razão de 30%.

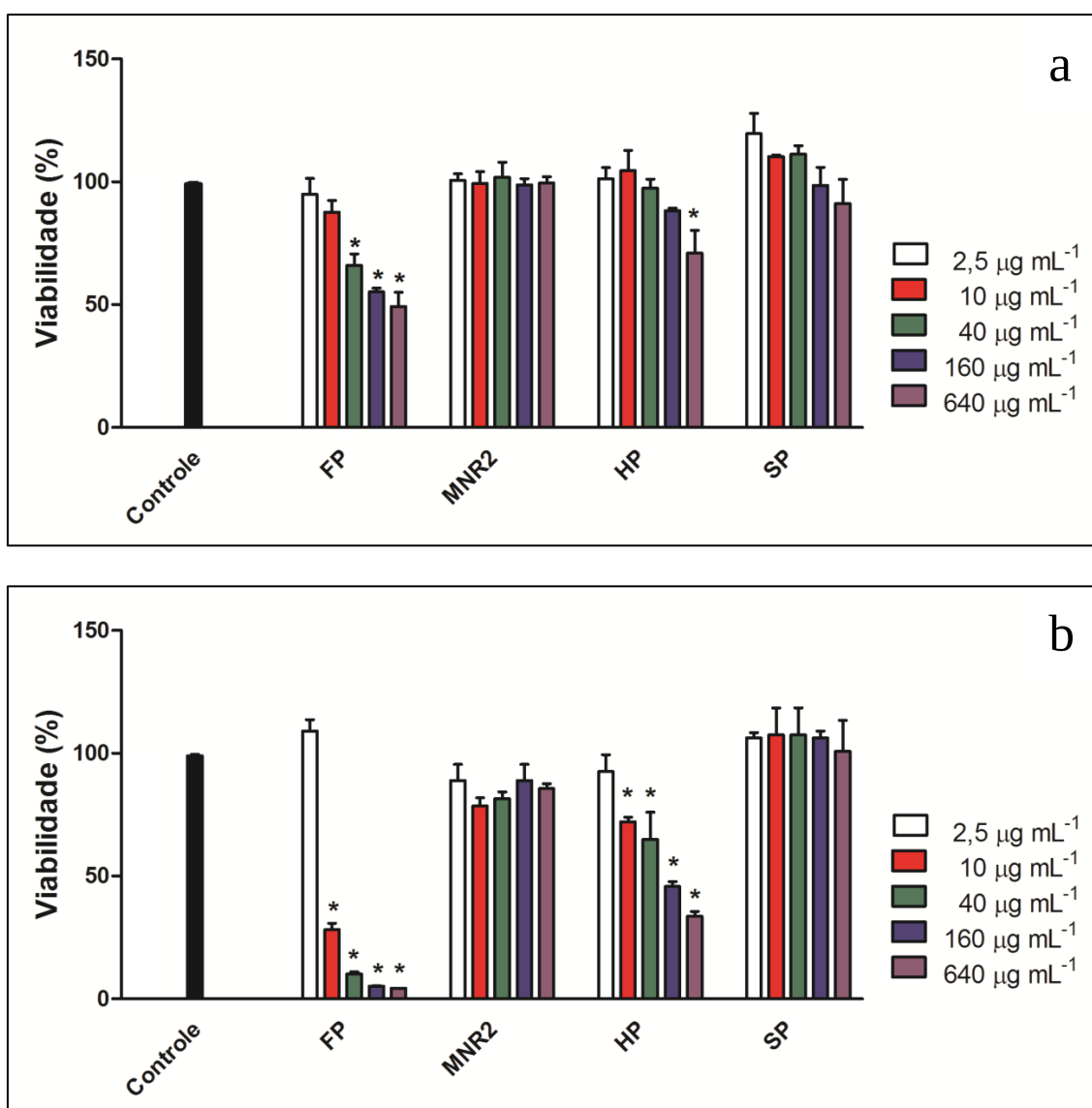


Figura 47 – Efeito das amostras na viabilidade celular, nas concentrações de 2,5; 10; 40; 160 e $640 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Nota: Os valores representam a média $\pm$ EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata. Em (a), viabilidade no tempo 24 h e (b) 48 h. * $p < 0,05$ pelo teste de Tukey em relação ao controle.

Fonte: O autor.

Analisando o tempo de 48 h (Figura 47b), nota-se um perfil semelhante, onde as frações SP e MNR2 não promoveram diminuição da viabilidade e FP e HP apresentaram maior diminuição da viabilidade em relação ao tempo de 24 h. As frações FP e HP foram as amostras que promoveram a diminuição da viabilidade celular dos macrófagos, em relação ao controle. Para FP, nas concentrações de 10, 40, 160 e 640 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as percentagens de diminuição foram de 71,9; 89,8; 94,8; 95,7%, respectivamente. A fração HP apresentou diminuição da viabilidade, para as concentrações 10, 40, 160 e 640 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nas percentagens de 28; 35,2; 54,3 e 66,4%. Tal fenômeno demonstra uma característica de FP que poderia ser utilizada na prospecção da capacidade anti-tumoral, visto que em baixas concentrações essa molécula poderia também de diminuir a viabilidade destas células.

5.8.2. Determinação da produção de óxido nítrico

Uma vez que a via de produção do NO^* é essencial em alguns processos de defesa contra patógenos, inflamação (NATHAN, 1987; NATHAN, 1997) e no processo da resposta imune (BOGDAN, 2001), foram estudadas a capacidade das amostras frente ao ensaio de produção de óxido nítrico pelas células. O experimento foi conduzido no tempo de 48 h e utilizaram-se as mesmas concentrações das amostras testadas no ensaio de viabilidade.

A via de síntese de NO^* demanda mais tempo para se iniciar quando comparada com outras vias como a de produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Isso se deve a necessidade de expressar a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a qual não é expressa em grande quantidade em macrófagos não ativados (KORHONEN *et al.*, 2005). Portanto, as análises feitas em 48 h (Figura 48) de tratamento mostram que FP apresentou uma produção de NO^* significativa nas concentrações 10, 40, 160 e 640 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com percentuais de aumento em relação ao controle negativo de 294, 331, 350, 320%, respectivamente. A amostra MNR2 não apresentou diferença significativa na produção de NO^* para todas as concentrações. Para HP, todas as concentrações apresentaram efeito significativo em relação ao controle, com percentagens de 229, 225, 250, 254 e

217%. Como observado na figura 48, SP apresentou efeito significativo na concentração de NO^* , para todas as concentrações testadas, onde as percentagens de produção de NO^* em relação ao controle foram de 200, 200, 222, 212 e 260%.

Tal aumento poderia ser promovido pela presença de contaminação por LPS bacteriano. Sua presença em baixas concentrações faz com que a produção de NO^* aumente. Contudo, todas as moléculas foram tratadas com polimixina B, um antibiótico conhecido pelo efeito neutralizante da resposta envolvendo LPS (CUNHA et al., 1993; STORN, 1977) e desta forma, o efeito observado ficaria a cargo somente do polissacarídeo.

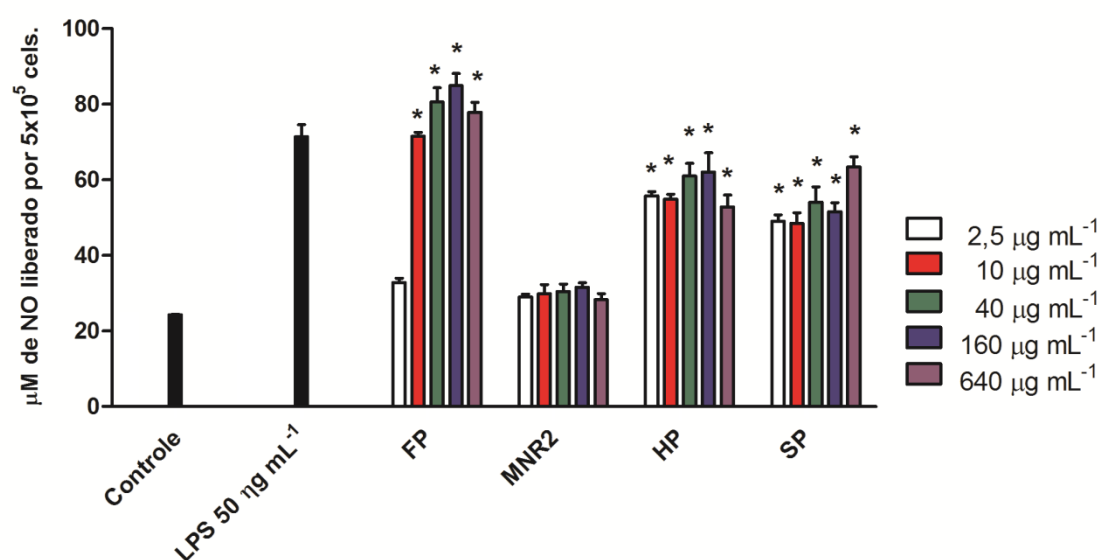


Figura 48 – Efeitos das amostras na produção de óxido nítrico por macrófagos aderentes incubados por 48 h, na ausência (controle) e presença das amostras.

Nota: LPS 50 ng mL^{-1} foi utilizado como controle positivo. Os valores representam a média $\pm$ EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata. * $p < 0,05$ pelo teste de Tukey em relação ao controle

Fonte: O autor.

Trabalho realizado por Rosário (2006), utilizando xiloglucanas tratadas com polimixina B mostrou que não houve alteração na produção de óxido nítrico para duas amostras estudadas (XGC e XGM), porém com a amostra XGJ foi observado uma diminuição significativa na produção deste radical nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que para a autora poderia tratar-se também de uma possível interação com o polissacarídeo, fazendo com este não fosse mais capaz de estimular a síntese de NO^* . Ramamoorthy, Kemp e Tizard (1996) observaram que uma manana acetilada de plantas do gênero aloe (acemanana) na presença de $\text{IFN-}\gamma$ também aumentou a produção de NO^* . Os resultados destes autores sugerem que esta manana tem efeito sinérgico com o $\text{IFN-}\gamma$ e ativa a transcrição do gene da iNOS.

Uma característica da acemanana, um polissacarídeo de alta massa molar obtido a partir do extrato de *A. barbadensis*, testado em uma cultura de medula óssea de galinhas, foi o aumento da produção de óxido nítrico produzido pelos macrófagos, que por sua vez contribuiu para a citotoxicidade (KARACA, SHARMA, NORDGREN, 1995), sendo uma possível explicação para a diminuição da viabilidade em células tratadas com FP.

Em estudos realizados por Im e colaboradores (2005), utilizando polissacarídeos de *A. barbadensis*, separados por coluna de cromatografia Sephacryl S400 HR, observaram que uma fração polissacarídica com massa molar maior ou igual a 400 kDa e outra com massa molar variável entre 5 e 400 kDa foram capazes de estimular a síntese do óxido nítrico em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264.7. Com esta mesma linhagem celular, Zhang e Tizard (1996) e Ramammorthy, Kemp e Tizard (1996) demonstraram que acemanana sozinha não foi capaz de aumentar a concentração de óxido nítrico na cultura e que neste caso, somente em presença de $\text{INF-}\gamma$ os macrófagos foram estimulados a produzir NO^* , num período de 48h. Este resultado levou os autores a considerar que para a ativação da via de síntese do NO^* , seria necessário um segundo sinal, papel este desempenhado pelo polissacarídeo, que aumentaria a sensibilidade do macrófago ao estímulo do $\text{INF-}\gamma$.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que as amostras sozinhas foram capazes de estimular a síntese de NO^* , não sendo

necessária a presença de um segundo sinal. Este sinal poderia ser o LPS, caso as amostras não tivessem sido tratadas com Polimixina-B, sendo portanto uma hipótese que não se confirmou. Culturas celulares tratadas podem também expressar $\text{TNF-}\alpha$, que podem também ser sinergista para a produção de NO^* , sugerindo que múltiplos mediadores podem atuar para a expressão do gene da iNOS (RAMAMMORTHY, KEMP, TIZARD, 1996). Sabe-se que os macrófagos expressam em sua superfície diversos receptores, dentre eles, o receptor manose, o qual pertence à classe de receptores com domínios lectina e são capazes de reconhecer unidades de manose, bem como, unidades de fucose (TAYLOR et al. 2005) e além de expressar estes receptores, a ligação de moléculas ricas em manose, como as utilizadas neste estudo, devem possuir uma estrutura tal que permita sua ligação a eles.

Considerando o tamanho e a estrutura linear das frações estudadas neste trabalho é possível sugerir que a fração de maior massa molar (FP) foi capaz de realizar um maior estímulo para a atividade de iNOS, seguido por HP e SP.

5.8.3. Dosagem de citocinas

Foram ainda mensurados o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e interleucina-6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), produzidos e liberados no sobrenadante por macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento de 24h com as amostras, testados nas concentrações de 10, 40 e $160 \mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 49a mostra o efeito das amostras na produção de $\text{TNF-}\alpha$. A amostra FP apresentou as maiores percentagens de produção de $\text{TNF-}\alpha$ em relação ao grupo controle (negativo). Células tratadas com 10, 40 e $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FP resultaram em 246, 192 e 198% de aumento na produção desta citocina. Outra amostra (HP), apresentou diferença significativa na concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, resultando em 258% de aumento.

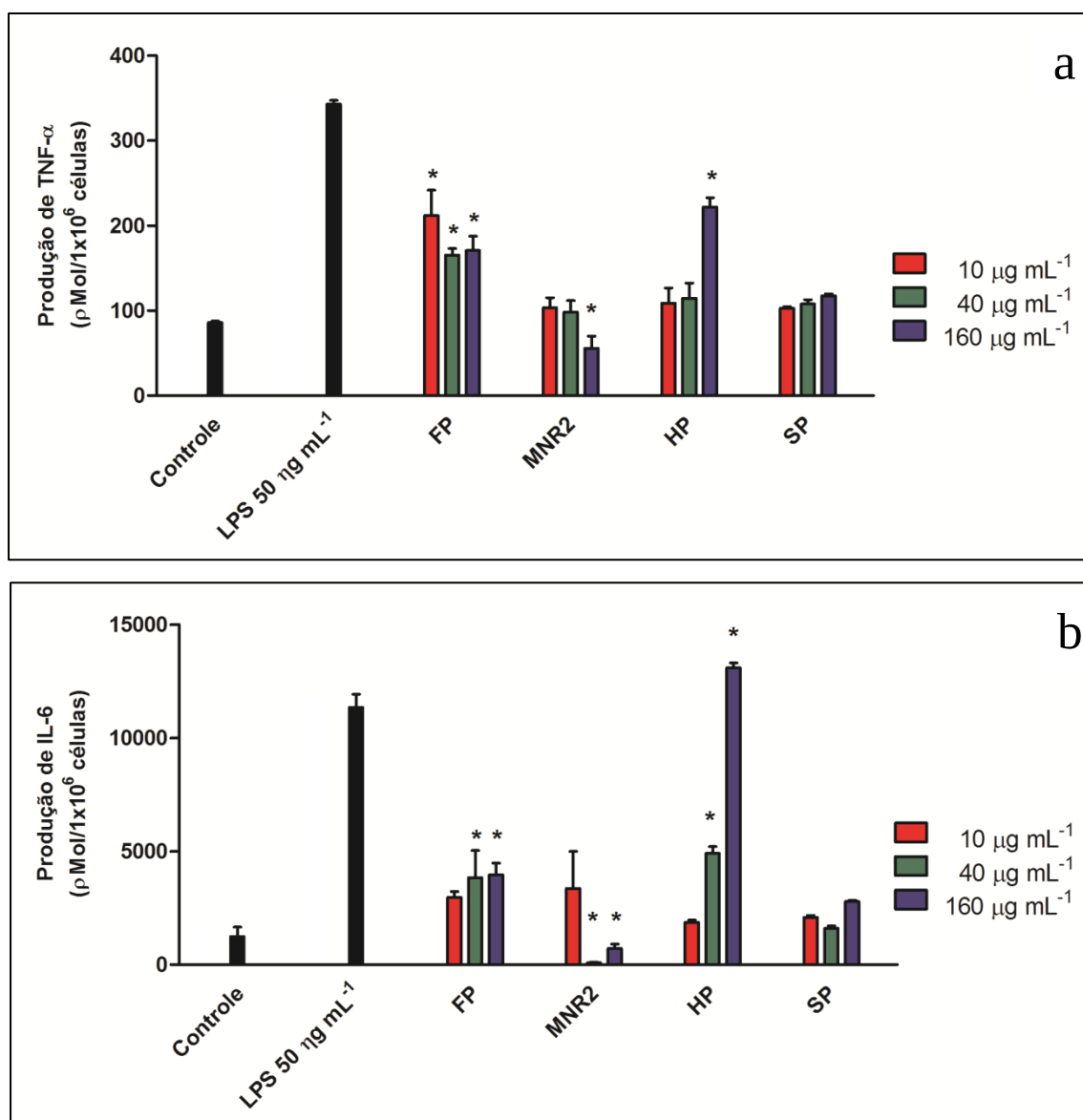


Figura 49 – Efeitos das amostras na produção de citocinas TNF- α (a) e IL-6 (b) por macrófagos aderentes incubados por 24 h, na ausência (controle) e presença das amostras.

Nota: LPS 50 ng mL⁻¹ foi utilizado como controle positivo. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 2 experimentos independentes cada um em duplicata. * $p < 0,05$ pelo teste de Tukey em relação ao controle.

Fonte: O autor.

Apesar de ter tido este aumento os valores poderiam estar subestimado por que pelos dados de viabilidade apenas 50% da viabilidade celular foi verificada após 24h nas culturas crescidas na presença de FP (40 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e HP (160 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Como não foi realizado outro teste de viabilidade, como por exemplo, o azul de tripan, para verificar o numero de células não se pode ter certeza se a fração FP interfere na adesão celular (o que levaria ao menor numero de células) ou altera a atividade das enzimas mitocondriais.

Dentre as frações obtidas pelo tratamento enzimático, SP apresentou uma curva concentração-dependente, cujo aumento foi de 119, 125 e 136%. Já MNR2 não mostrou diferença significativa em relação ao controle. Porém, na concentração de 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$, houve uma inibição da síntese desta citocina na ordem de 35%.

A figura 49b apresenta os resultados obtidos para a citocina IL-6 secretadas pelos macrófagos tratados com as amostras nas três concentrações relatadas. A dosagem de IL-6 mostrou que somente as concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da amostra FP (308 e 320%) e HP (395 e 1054%), foram capazes de atuar de modo significativo no aumento da produção desta interleucina. Mesmo não perfazendo uma diferença significativa, é importante notar um estímulo positivo para as concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da amostra FP (238%) e SP (168, 130 e 223% respectivamente). Ainda, a amostra MNR2 nas concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram uma inibição da expressão de IL-6 da ordem de 1553 e 174,7%, respectivamente.

No que se refere à produção de IL-10 (Figura 50a) observou-se que somente MNR2 nas concentrações de 10 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram capazes de estimular a produção desta interleucina, com percentagens de 209 e 159%. Para as demais amostras, nenhuma proporcionou diferença significativa nas concentrações de IL-10 em relação ao controle negativo.

Para IL-1 β (figura 50b), foi possível observar um comportamento inverso ao observado nas análises anteriores. Neste caso as amostras apresentaram em sua maioria, diminuição da concentração da citocina no sobrenadante das células cultivadas.

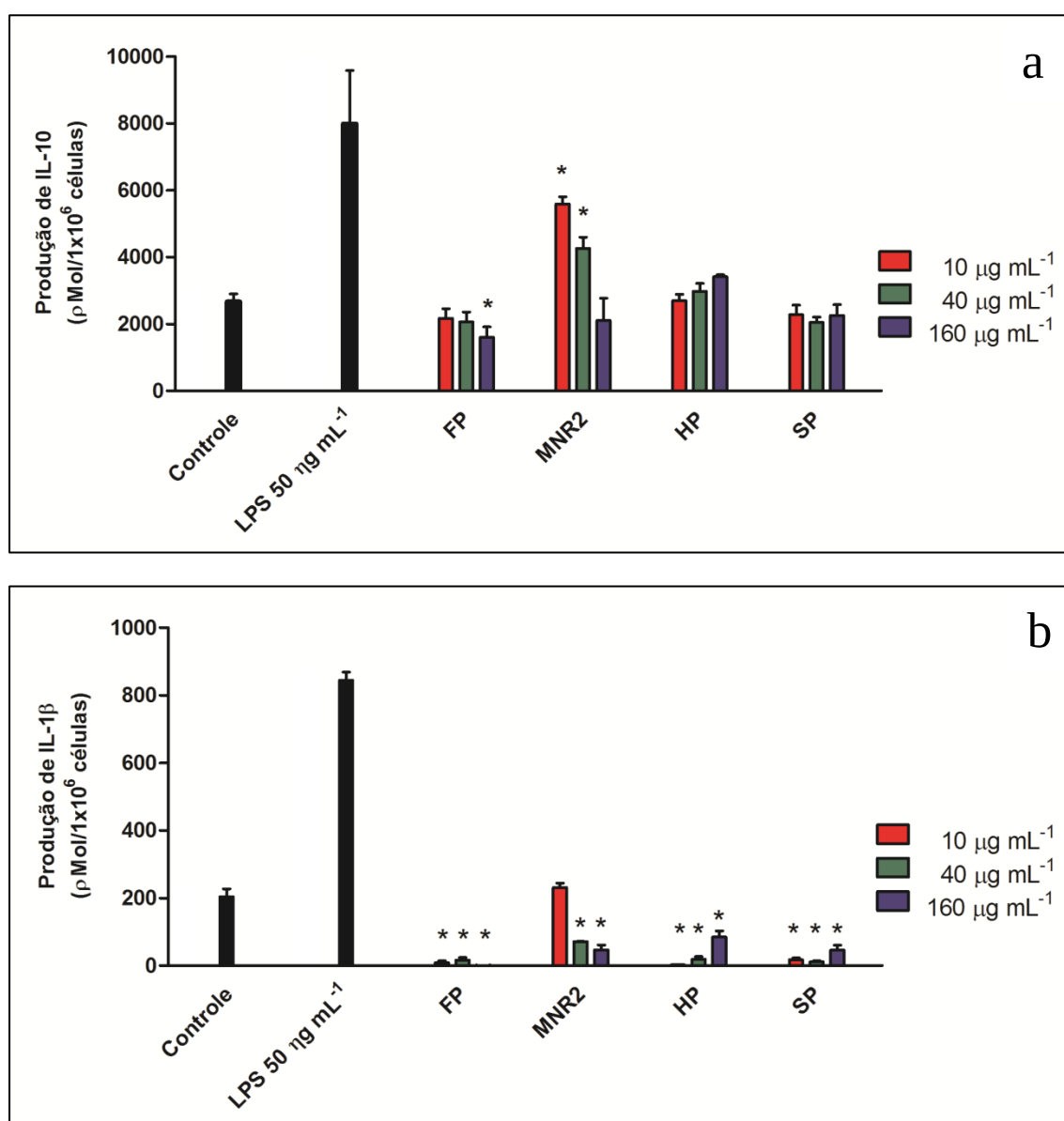


Figura 50 – Efeitos das amostras na produção de citocinas IL-10 (a) e IL-1β (b) por macrófagos aderentes incubados por 24 h, na ausência (controle) e presença das amostras.

Nota: LPS 50 ng mL⁻¹ foi utilizado como controle positivo. Os valores representam a média±EPM de 2 experimentos independentes cada um em duplicata. * $p < 0,05$ pelo teste de Tukey em relação ao controle.

Fonte: O autor.

Na presença de FP, a percentagem da citocina detectada para todas as concentrações (10, 40 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi de 2355, 1254 e 4705% menor que o grupo controle. Igualmente, HP inibiu 8580, 1074 e 243% respectivamente.

A fração MNR2 promoveu uma diminuição nas concentrações de 40 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em percentual de 287 e 434%. Já o efeito causado por SP foi observado para todas as concentrações (10, 40 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nas percentagens de 1201, 1807 e 440% em relação ao controle negativo.

Leung e colaboradores (2004) estudaram os efeitos biológicos de três frações polissacarídicas extraídas das folhas da planta *A. vera*. As frações apresentavam manose como monossacarídeo majoritário e de massa molar de 10000 kDa (fração I), 1300 kDa (fração II) e 470 kDa (fração III). No que se refere à produção de citocinas, os autores relataram que, dependendo da fração utilizada, a produção de IL-1 β , por macrófagos peritoneais, apresentou uma variação de percentual de 31466% para a fração I ate 19266% para a fração III, quando comparado com o grupo controle, intensidade similar ao observado para o LPS.

Os autores observaram que a quantificação de TNF- α foi superior a de IL-1 β , variando entre 114400 para fração I a 143200% para a fração III, quando comparado ao controle. Já a produção de IL-6 foi avaliada em linfócitos T e B tratados com as diferentes frações dos polissacarídeos, que promoveram aumento que variaram entre 25750% para a fração I ate 27400% para a fração III. A fração I, que apresentou o maior teor de manose e massa molar, foi identificada como o mais potente modificador da resposta biológica, o que levou os autores a sugerir que a potência aumenta proporcionalmente com o conteúdo de manose e com a massa molar.

A partir do suco comercial da espécie *A. barbadensis*, Pugh e colaboradores (2001) obtiveram um polissacarídeo denominado aloeride, que apresentava composição monossacarídica distinta dos polissacarídeos obtidos por Leung e colaboradores (2004), constituído por unidades de glucose (37,2%), galactose (23,9%), manose (19,5%) e arabinose (10,3%). Entretanto, as respostas biológicas obtidas para o aloeride corroboram com os resultados acima descritos, pois o polissacarídeo foi capaz de induzir a expressão do mRNA o qual codifica IL-1 β e TNF- α de forma similar ao estímulo provocado pelo LPS.

Trabalho desenvolvido por Karaca, Sharma e Nordgreen (1995), relatam que uma modesta ativação de macrófagos pela acemanana acontece à concentrações entre 200 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta faixa de concentração é superior aquelas utilizadas no trabalho aqui desenvolvido. No entanto, utilizando concentrações acima de 640 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para as frações aqui estudadas, poder-se-ia incorrer no aumento de toxicidade e com isto, não seria observado o valor verdadeiro da indução da produção de citocinas, recordando que FP diminuiu a viabilidade celular em baixas concentrações no tempo de 24 h (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), fazendo com que a avaliação para a molécula de maior massa molar fosse inviabilizada a altas concentrações.

A ativação de macrófagos da linhagem RAW 264.7 por um polissacarídeo de alta massa molar (acemanana 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), obtido da planta *A. barbadensis*, foi avaliado por 24 h, sozinha e em combinação com IFN- γ (10U/mL) em relação à produção de citocinas IL-6 e TNF- α . As citocinas responderam de forma dose-dependente, sugerindo que não houve a necessidade da presença de IFN- γ para que as culturas fossem estimuladas (ZHANG, TIZARD, 1996).

No trabalho aqui desenvolvido a inibição da atividade de IL-1 β poderia ser explicada devido à expressão de dois receptores de IL-1, identificados como tipo I e tipo II. O domínio extracelular do receptor tipo IL-1 II é libertado a partir de certas células e pode funcionar como um inibidor específico da atividade da IL-1 β , tal como é mostrado na figura 51 (SYMONS, YOUNG, DUFF, 1995).

A ativação celular em resposta a IL-1 é mediada através do receptor tipo I de IL-1 (IL-1 RI), o receptor funcional de sinalização e do receptor de IL-1 do tipo II (IL-1 RII), que não é uma molécula de sinalização e é descrito como sendo uma “armadilha” alvo de IL-1 (Figura 51). Além disso, o IL-1 RII é expresso na superfície da célula e liberado para o meio extracelular como uma molécula solúvel (IL-1 sRII), que captura IL-1 e inibe sua ligação a IL1 RI (KONDERA-ANASZ et al., 2005; AREND et al., 1998).

Enquanto a produção de IL-1 pode ser diminuída ou ter seus efeitos limitados também pelas chamadas citocinas anti-inflamatórias, *in vitro*, os efeitos inflamatórios da IL-1 são inibidos e podem ser totalmente abolidos

somente por um poderoso inibidor específico da IL-1, o qual é um antagonista para essa interleucina, o receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) (DINARELLO, 1996), o qual compete com IL-1 pela ligação a IL-1 RI, sem o desencadeamento da transdução de sinal e ativações celulares (KONDERA-ANASZ et al., 2005; AREND et al., 1998).

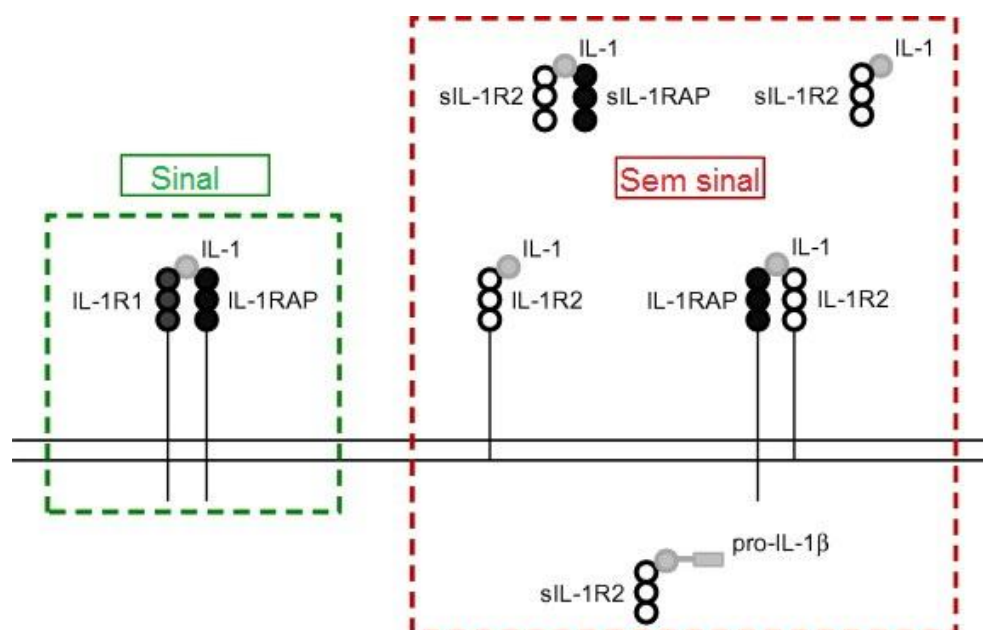


Figura 51 – Ação dos receptores de membrana e receptores solúveis de IL-1.

Nota: O domínio extracelular de receptores de citocinas como a IL-1 β pode ser clivada enzimaticamente e libertados para o espaço extracelular. O domínio extracelular retém a capacidade de ligação do ligante e o receptor solúvel pode atuar como um inibidor por impedir a ligação do ligante ao receptor celular.

Fonte: Peters, Joesting, Freund, 2012.

Assim, sugere-se a importância do papel da IL-1 RII, a sua forma solúvel de IL-1 sRII e IL-1 Ra na regulação das atividades biológicas de IL-1 nas locais inflamatórias.

Dessa maneira, os macrófagos tratados com as amostras utilizadas neste estudo poderiam estimular a liberação dos receptores solúveis de IL-1 β , uma vez que a liberação dos inibidores ocorre concomitante com a citocina, em concentração aproximada de 100 vezes (HOPKINS, 2003).

5.8.4. Morfologia dos macrófagos

Também foi avaliada as alterações na morfologia dos macrófagos cultivados na presença das frações estudadas, nas concentrações de 10 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As fotomicrografias estão apresentadas nas figuras 52 e 53.

A partir das imagens obtidas foi possível observar que as amostras foram capazes de modificar a morfologia dos macrófagos, quando comparadas com o controle negativo, os quais foram apenas incubados com meio de cultura.

Estas células apresentaram morfologia descrita para macrófagos ativados, nos quais estes apresentam maior vacuolização e projeções citoplasmáticas. A partir da concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todas as amostras, foi possível observar um número crescente destas estruturas.

Células da linhagem RAW 264.7 quando tratadas por 24h com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de acemanana, o polissacarídeo de alta massa molar obtido da *Aloe barbadensis* mostrou uma modificação na morfologia das células (ZHANG, TIZARD, 1996). Nas concentrações estudadas neste trabalho, o maior número de células ativadas foram observadas nas concentrações de 40, 160 e 640 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no entanto, ensaios mais acurados como a citometria de fluxo e experimentos envolvendo a capacidade fagocítica destas células poderiam ser realizados com o intuito de confirmar os resultados aqui encontrados.

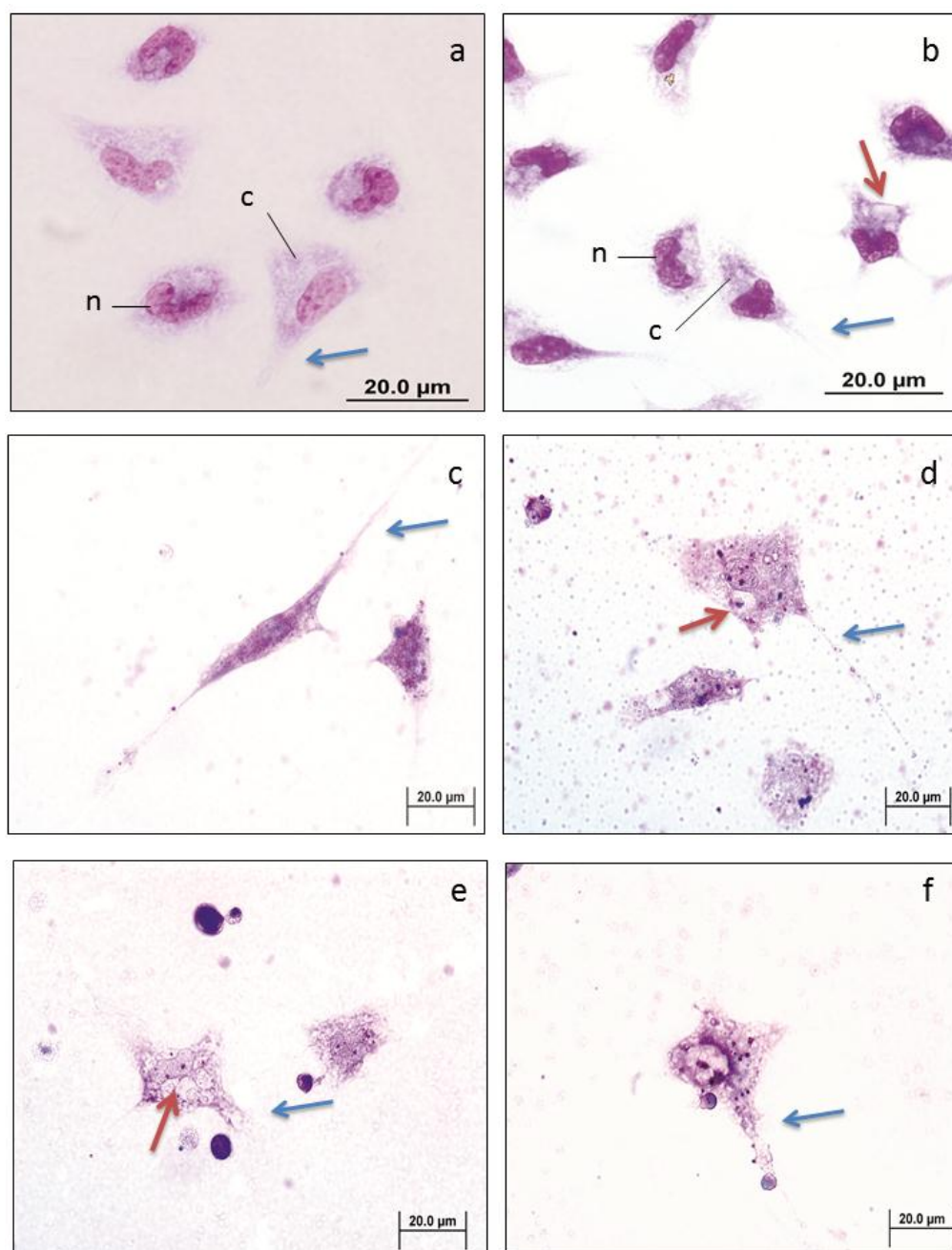


Figura 52 – Efeito do tratamento de 24 h com a fração FP e HP sobre a morfologia de macrófagos peritoneais de camundongos

Nota: Em (a), células não tratadas, (b) células tratadas com LPS 50 $\eta\text{g.mL}^{-1}$, (c) e (d) células tratadas com a fração FP 10 e 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (e) e (f) células tratadas com a fração HP 10 e 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. As setas vermelhas apontam as projeções citoplasmáticas e as setas azuis, os vacúolos. n – núcleo, c – citoplasma.

Fonte: O autor.

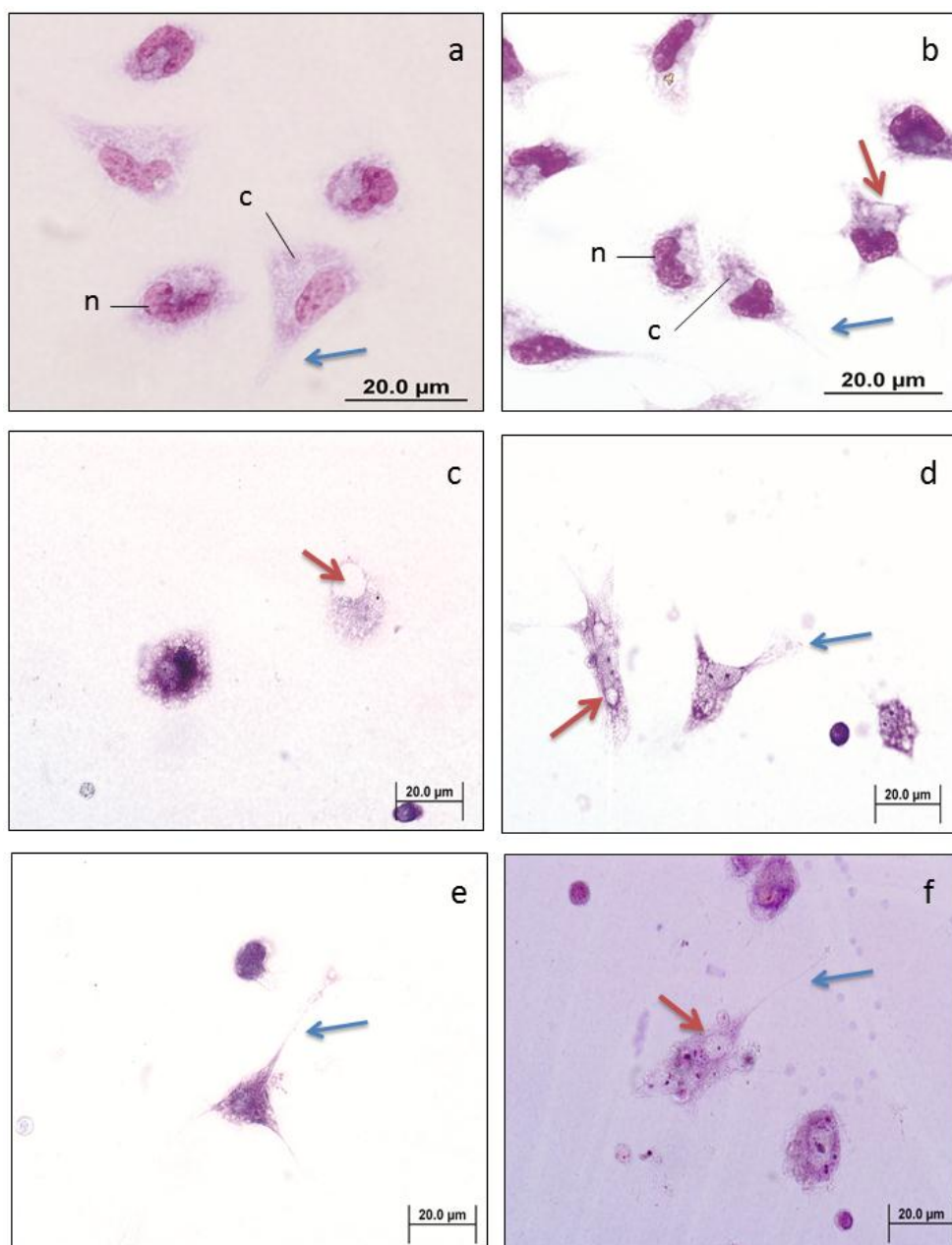


Figura 53 – Efeito do tratamento de 24 h com a fração MNR2 e SP sobre a morfologia de macrófagos peritoneais de camundongos.

Nota: Em (a), células não tratadas (grupo controle negativo), (b) células tratadas com LPS 50 $\eta\text{g.mL}^{-1}$ (grupo controle positivo), (c) e (d) células tratadas com a fração MNR2 10 e 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (e) e (f) células tratadas com a fração SP 10 e 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. As setas vermelhas apontam as projeções citoplasmáticas e as setas azuis, os vacúolos. n – núcleo, c – citoplasma.

Fonte: O autor.

5.9. Ensaios de edema de pata

A figura 54 apresenta os resultados encontrados para o ensaio de edema de pata induzida pela carragenina (Cg). A amostra FP (Figura 54a), demonstrou um comportamento semelhante à dexametasona em relação à inibição do edema de pata induzido pela carragenina (Cg).

A injeção de Cg na pata faz com que a ação farmacológica das frações seja observada a partir do tempo de 30 min. Os gráficos demonstram que a prevenção da formação do edema em injeção intra-plantar de forma única (20 $\mu\text{g pata}^{-1}$) teve os resultados significativos para as amostras FP e SP (Figura 54b). Em FP, os tempos significativos foram em 60, 120 e 240 min com 46%, 28% e 33%, respectivamente, em relação ao mesmo tempo do controle negativo. A fração SP apresentou significância em todos os tempos de ensaio, com 48%, 41%, 35% respectivamente. Da mesma forma, o tratamento com dexametasona também impediu a formação de edema no mesmo intervalo de tempo, com inibições de 70%, 70% e 64,2%, respectivamente.

Em termos percentuais de inibição a fração SP apresentou um perfil anti-inflamatório superior aos polissacarídeos nativos, em que o perfil de inibição de edema foi superior à dexametasona. Já FP, apresentou um perfil idêntico ao anti-inflamatório de referência.

As amostras HP e MNR2 não apresentaram efeito significativo na dose testada e na via de administração. Como é observado nos gráficos da figura 54a, HP mostrou-se edematogênica, potencializando o efeito da Cg. Já MNR2 (Figura 54b), teve efeito anti-inflamatório significativo nos tempos 60 e 120 min e ao final do período do experimento apresentou valor idêntico ao do controle.

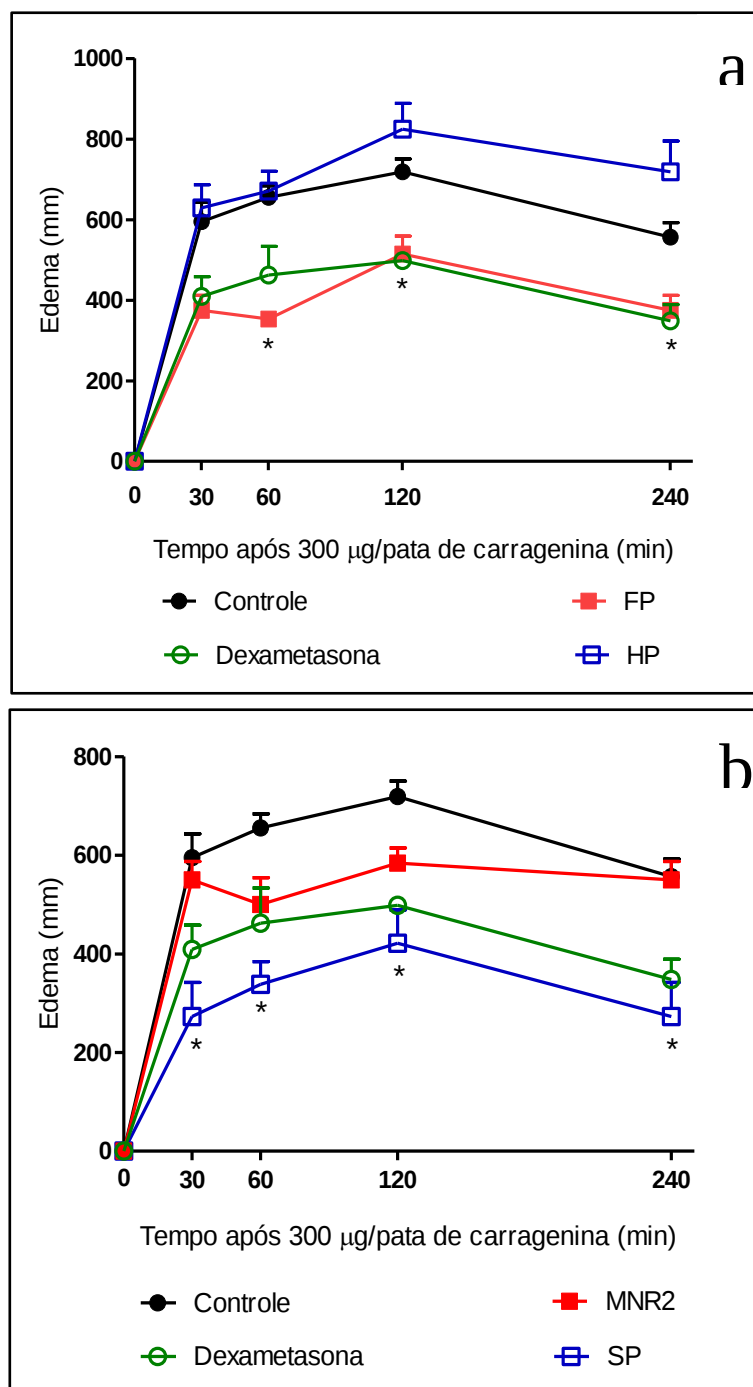


Figura 54 – Efeito das frações FP e HP (a) e MNR2 e SP (b) na concentração de 20 µg pata⁻¹, no ensaio de edema induzido pela carragenina administrada intraplantar. Dexametasona 0,5 mg kg⁻¹ intraplantar foi utilizada como controle positivo.

Nota: Cada barra representa a média±EPM de 5 animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância: * $p < 0,05$ em relação ao controle, pelo teste de Tukey.

Fonte: O autor.

A partir do experimento com aplicação das amostras para avaliar o efeito local, foi executado um novo experimento a fim de avaliar o efeito sistêmico, sem aumentar a concentração relativa dos polissacarídeos, visto que em média, para cada camundongo (35 g) foi injetado na região dorsal, 350 μg de massa das frações testadas.

Os resultados do experimento foram avaliados ao final de 2 h, visto que no experimento anterior, o pico de inibição deu-se entre o tempo 60 e 240 min. A figura 55 expressa o resultado do experimento.

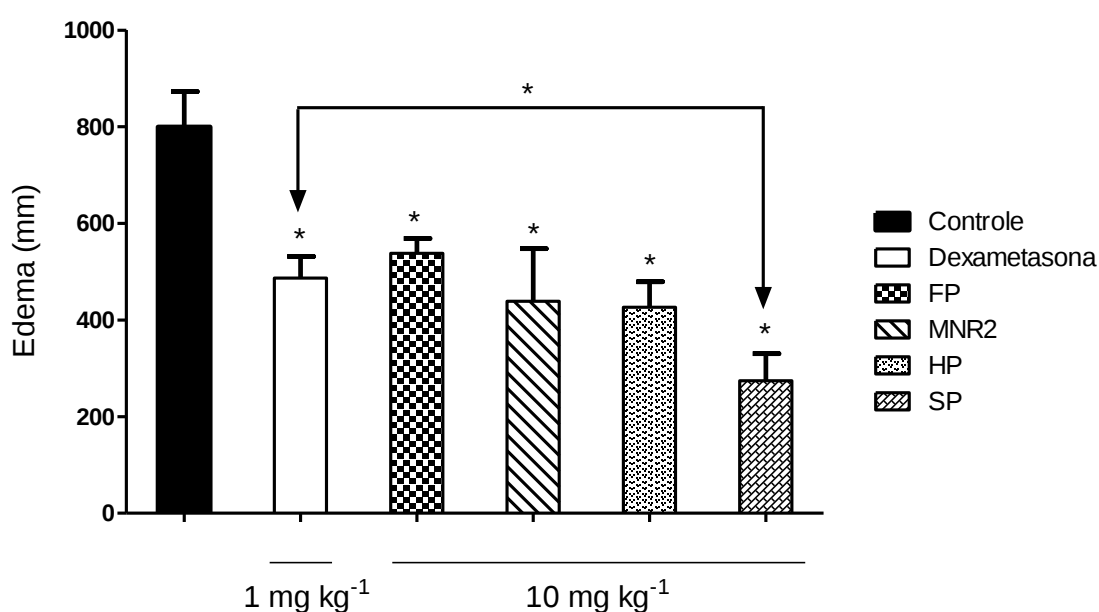


Figura 55 – Efeito anti-inflamatório das amostras administradas pela via sub-cutânea (10 mg kg^{-1}), no ensaio de edema induzido pela carragenina (Cg), após 120 min. Dexametasona $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ intraplantar foi utilizada como controle positivo.

Nota: Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle, pelo teste de Tukey.

Fonte: O autor.

Todas as amostras testadas através desta via de administração apresentaram efeito significativo na diminuição do edema de pata, quando comparadas ao controle. As amostras FP, MNR2, HP e SP apresentaram 32,7%, 45,2%, 46,7% e 65,7% de inibição, respectivamente. Além disso, dexametasona (1 mg kg^{-1}) apresentou poder de inibição de cerca de 39%.

Quando são comparadas as médias dos volumes de edema dos animais tratados com dexametasona com as demais frações, vemos que não há diferença significativa entre elas, à exceção da fração SP que a exemplo dos experimentos intraplantar, mostrou-se superior à dexametasona, onde a variação percentual de SP em relação à molécula de referência foi cerca de 26%.

Polissacarídeos são utilizados como fontes de compostos anti-inflamatórios. Os exemplos mais clássicos são o do sulfato de glucosamina e do condroitin sulfato, de origem animal, utilizados para tratamento de inflamações ósteo-articulares. Foi demonstrado que a absorção deste glucosaminoglicano via oral depende do tamanho da cadeia, densidade de cargas e presença elevada de grupos sulfatos. Após a administração, eles são quebrados em oligossacarídeos e polissacarídeos de menor massa molar, sendo assim enviados ao seu sítio de ação devido à presença de pontas reductoras, que são os marcadores de endereçamento, principalmente em cartilagens e líquido sinovial, onde atuam como redutores da inflamação e dor (RONCA et al., 1998).

Glucanas de origem vegetal são estudadas como possíveis candidatos a compostos anti-inflamatórios, como as encontradas na cana-do-brejo (*Costus spicatus*). As três glucanas encontradas nesta planta, possuem cadeia principal composta por ligações do tipo α -(1 $\rightarrow$ 3), com cadeias laterais de unidades glucopiranosil em α -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) e apresentaram efeito fagocítico e inibidor da permeabilidade capilar. Estas estruturas são altamente ramificadas e por consequência sua estrutura tridimensional dificulta a passagem para a circulação, quando ingeridas via oral. Os autores sugeriram que uma amilase humoral pode hidrolisar certas ligações como as α -(1 $\rightarrow$ 4) e possivelmente as α -(1 $\rightarrow$ 3), clivando as grandes moléculas de glucanas em polissacarídeos

menores, porém longas o suficiente para exercer suas atividades (Da SILVA, PARENTE, 2003).

Também β -glucanas de origem fúngica são alvo de estudos pela capacidade de atuar no processo de dor e inflamação. Muitos cogumelos do gênero *Agaricus*, *Lentinula* e *Pleurotus* foram investigados quanto às atividades biológicas (MARINO et al., 2003). A glucana isolada do basidiomiceto *Geastrum saccatum*, injetada intravenosa mostrou redução do edema de orelha em camungongos, na ordem de 60,4% para a concentração de 10 mg kg⁻¹ e 21,3% para a 50 mg kg⁻¹, demonstrando que altas concentrações não são eficazes na redução do edema (DORE et al., 2007).

Dentre as classes de polissacarídeos vegetais, as pectinas são citadas como sendo capazes de atuar na diminuição do processo inflamatório. A exemplo disso, uma pectina isolada de *Comarum palustre*, denominada comarumana, apresentou efetividade de 59% em 24 h de ensaio, sendo que ao final do sétimo dia de avaliação, apresentou resposta anti-inflamatória de 29% (POPOV et al., 2005). Trabalhos realizados com uma glucomanana acetilada obtida de bulbos de orquídeas do gênero *Cyrtopodium* mostrou-se eficaz na inibição da permeabilidade vascular, que é um primeiro estágio do processo inflamatório (BARRETO, PARENTE, 2006). Já, uma galactomanoglucana encontrada em mesocarpos de frutos do jerivazeiro mostrou potencial anti-inflamatório significativo no controle da fase inicial do processo inflamatório, provocando uma inibição da formação de edema semelhante aos compostos de referência, indometacina e dexametasona. No entanto, o polissacarídeo exibiu menor atividade quando comparada com os controles na fase tardia da inflamação (Da SILVA, PARENTE, 2010).

Um estudo realizado por Vázquez e colaboradores (1996), utilizou a fração polissacarídica bruta de *A. barbadensis*, que foi testada na dose de 100 mg kg⁻¹ no ensaio de edema de pata e inibiu a formação de edema em uma percentagem semelhante à inibição produzida pelos agentes anti-inflamatórios bem estabelecidos, como a indometacina e dexametasona. Esta última por possuir características esteroideais inibe a enzima fosfolipase A₂, que é responsável pela liberação de ácido araquidônico, o substrato para a produção de prostaglandina (BLACKWELL et al., 1980). Ao incubar microssomos contendo ciclooxigenase e ácido araquidônico marcado, foi gerado

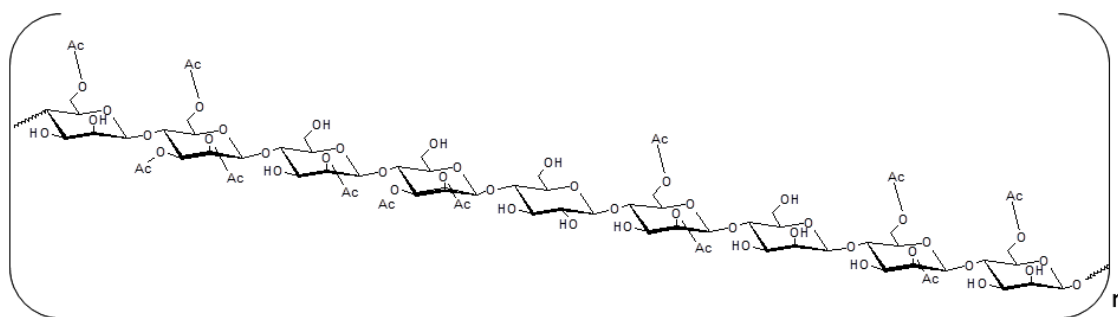
principalmente PGE2. Este sistema, na presença do extrato aquoso ou também de indometacina, tiveram sua produção inibida. Dessa forma, os autores sugeriram que o efeito anti-inflamatório encontrado para o extrato aquoso de *A. barbadensis* está relacionado com a inibição da ciclooxigenase (VÁZQUEZ et al., 1996).

Em nosso estudo, as frações FP e SP foram as que apresentaram melhores resultados no ensaio intraplantar, já no ensaio de injeção sistêmica das amostras, todas foram efetivas no tempo de 120 min, com destaque novamente para SP. Devido ao pequeno tamanho (~4 kDa) SP pode difundir-se melhor nos tecidos e chegar à corrente sanguínea, sendo distribuída pelo organismo, bem como realizar uma ação local. Esta fração, em ensaio *in vitro*, de cultivo de macrófagos não mostrou-se citotóxica, sendo portanto uma boa candidata a futuros ensaios no sentido da criação de um medicamento, devido à característica única da fração.

FP é a fração de maior massa molar obtida de *A. barbadensis* (1230 kDa). Nos ensaios em cultivo celular foi a que apresentou maior diminuição da viabilidade celular, para as concentrações testadas. Entretanto, nos ensaios de edema, foi efetiva na inibição de edema no tratamento intra-plantar. Dentro desta perspectiva, sugere-se que fatores como a massa molar, a conformação molecular e o grau de acetilação das frações sejam determinantes na ação anti-inflamatória. Outros ensaios complementares, como a migração de neutrófilos podem ser realizados, a fim de estabelecer os demais parâmetros para determinar os mecanismos pelos quais frações de características semelhantes, a não ser a massa molar, possuem ação sobre a inibição da inflamação.

6. Conclusões

Quimicamente FP é uma fração de alta massa molar (1230 kDa), composta por manose e glucose (24:1), de estrutura espacial linear, com alto grau de acetilação (18%), com grupamentos acetil ligados a C-2, C-3, C-2/C-3 e C-6. A provável estrutura de FP é mostrada abaixo.



A fração HP (53,2 kDa), mantém as características químicas da fração-mãe FP.

Na fração FP nativa tratada com β -endo-1, 4(1,3)- D-glucanase, além de SP (3,88 kDa), foram encontrados oligossacarídeos de dp 3 a dp 11 com variáveis graus de acetilação. Para a FP nativa tratada com β -endo-1, 4-D-mananase foi obtida somente a fração MNR2 (191,6 kDa).

Na fração FP desacetilada tratada com β -endo-1, 4(1,3)-D-glucanase, foram obtidos mono, di e trissacarídeos e uma fração desacetilada resistente à hidrólise. Na amostra de FP desacetilada tratada com β -endo-1, 4-D-mananase, obteve-se mono, di, tri e tetrassacarídeos.

Sugere-se que as enzimas atuam em porções do polissacarídeo onde há menor densidade de grupos acetil e que a mananase gera frações com maiores massas moleculares que a glucanase.

Ensaio reológicos determinaram que EA e FP possuem características pseudoplásticas e de fluido não-newtoniano para todas as concentrações estudadas. O aumento da concentração não mostrou diferença nas características reológicas estudadas, não sendo possível denominar estas frações de gel verdadeiro e sim de líquido viscoso. Ainda, as concentrações das amostras testadas mostraram um bom ajuste ao modelo matemático de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência).

As melhores atividades antioxidantes foram dadas pelas amostras EA e FP, especialmente em relação à captação de radicais hidroxilas e óxido nítrico. No geral, pode-se sugerir uma relação de massa molar e a atividade. Maiores massas moleculares exibiram maior atividade.

Nos ensaios de viabilidade celular para macrófagos foi observado diminuição acentuada na fração FP (24 h e 48 h) e para HP (48 h). Ao mesmo tempo, as frações FP, HP e SP mostraram-se estimuladora da produção de óxido nítrico mostrando que houve ativação dos macrófagos.

Ao serem mensuradas as interleucinas produzidas pela cultura de macrófagos tratados com as frações, TNF- α teve sua concentração aumentada em FP para todas as concentrações e HP em $160 \mu\text{g mL}^{-1}$. A produção de IL-6 foi aumentada na presença das frações à exceção de MNR2. Já produção de interleucina IL-10 somente foi aumentada na fração MNR2. As demais moléculas inibiram sua produção. Para IL-1 β , houve forte inibição da produção ou por inibição da detecção desta citocina, sugerindo que as frações estimulem a produção de receptores solúveis de IL-1 β . No geral, não foi observado uma clara relação entre a massa molar e a atividade de produção de interleucinas.

A morfologia dos macrófagos tratados com FP, MNR2, HP e SP, mostrou o efeito de estímulo à vacuolização e à formação de projeções citoplasmáticas, típicas de macrófagos ativados.

No teste de atividade anti-inflamatória, injeção intraplantar das frações FP e SP mostraram efeito local significativo, em relação ao controle. Nos ensaios de injeção subcutânea (efeito sistêmico), todas as frações apresentaram comportamento semelhante à dexametasona, mostrando uma relação entre massa molar e efeito antiinflamatório. A fração SP foi superior ao controle (dexametasona). As amostras mostraram um melhor efeito sistêmico que o efeito local.

7. Perspectivas

As perspectivas geradas a partir deste trabalho permitem a continuidade dos estudos:

1. Na avaliação dos mecanismos anti-inflamatórios principalmente em relação à fração SP, inédita em relação às características químicas e que melhor apresentou esta atividade;
2. Uma melhor investigação acerca das atividades sobre o sistema imune, das frações obtidas;
3. Estudos visando a elucidação da ação das enzimas empregadas neste estudo, sobre a FP na geração de oligossacarídeos;
4. A correlação existente entre a atividade anti-inflamatória e a antioxidante, especialmente sobre os mecanismos antioxidantes que os polissacarídeos apresentaram em alguns experimentos.

Além das oportunidades de continuação do trabalho, é possível também a geração de patentes advindas dos processos e produtos gerados, fazendo com que haja a valorização da atividade produtiva da planta que é a fonte dos compostos estudados.

8. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2008.

ADAMS, G. A. Constitution of a glucomannan from the sapwood of sugar maple (*Accer saccharum*). **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, p. 2423-2429, 1961.

ADEMARK, P.; LUNDQVIST, J.; HÄGGLUND, P.; TENKANEN, M.; TORTO, N.; TJERNELD, F.; STÅLBRAND, H. Hydrolitic properties of a β -mannosidase purified fro *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 281-289. 1999.

ALONSO-SANDE, M.; TEIJEIRO-OSORIO, D.; REMUÑÁN-LOPES, C.; ALONSO, M.J. Glucomanann, a promissing polysaccharide for biopharmaceutical purposes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 453-462. 2009.

ALVAREZ-MANCEÑIDO, F.; MARIANA, L.; MARTÍNEZ-PACHECO, R. Konjac glucomannan/xanthan gum enzyme sensitive binary mixtures for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 573-581, 2008.

AMARAL, A. **Avaliação dos efeitos de complexos polissacarídeos-oxovanádio (IV/IV) sobre macrófagos peritoneais de camindongos e *Leishmania in vitro***. Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Departamenteo de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, p. 103-108, 1996.

ARA, T.; DeCLERCK, Y. A. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. **European Journal of Cancer**, v. 43, p. 1223-1231, 2010.

AREND, W. P.; MALYAK, M.; GUTHRIDGE, C. J; GABAY, C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annual Review of Immunology**, v.16, p.27-55, 1998.

ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A. L.; CAMPOS-SÁ, L. F; JUNIOR, O. S.; VASCONCELOS, A. F. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de expolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, p. 895-899, 2010.

ARAÚJO, P.S.; SILVA, J.M.O.D.; NECKEL, C. A.; IANSSEN, C.; OLTRAMARI, A. C.; PASSOS, R.; TIEPO, E.; BACH, D.B.; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - Liliaceae). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 54-57, 1999.

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

ASPARLAN, M., HAITA, M. Rheological and sensory properties of pekmez (grape molasses/tahin) (sesame paste blends). **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 89-93, 2002.

ASPINAL, G. O. Mannans, galactomannans and glucomannans. In: **Polysaccharides**. [ASPINAL, G. O. Org]. New York: Pergamon Press Limited, p. 85-93, 1970.

AVILA, H.; RIVERO, J.; HERRERA, F.; FRILA, G. Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel. **Toxicol**, v. 35, p. 1423-1430, 1997.

BARNES, J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, p. 436-40, 1993.

BARRETO, S. W.; PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 287-291, 2006.

BAST, A.; HAENEN, G. R.; DOELMAN, C. J. Oxidants and antioxidants: state of the art. **The American Journal of Medicine**, v.91, p. 2S-13S, 1991.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. The toxicity of antioxidants and their metabolites. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 251-258, 2002.

BAUTISTA-PEREZ, R., SEGURA-COBOS, D., VÁSQUEZ-CRUZ, B. *In vitro* antibradykinin activity of *Aloe barbadensis* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 89-92, 2004.

BERCZI, I.; SZENTIVANYI, A. **Cytokines and Chemokines**. In: BERCZI, I.; SZENTIVANYI, A. **The Immune-Neuroendocrine Circuitry: History and Progress**. Elsevier Science. V 3, 2003.

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

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. **Fenômenos de Transporte**. Editorial Reverté, S.A., 1960.

BLACKWELL, G. J.; CARNUCCIO, R.; DiROSA, M.; FLOWER, R. J.; PARENTE, L.; PERSICO, P. Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoid. **Nature**, v. 287, p. 147-149, 1980.

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

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.

BOBBIO, PAULO A. **Química do processamento de alimentos**. 2ª Edição, Editora Varela, São Paulo, 1995.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, p. 907–916, 2001.

BOZZI, A.; PERRIN, C.; AUSTIN, S.; ARCE VERA, F. Quality and authenticity of commercial *Aloe vera* gel powders. **Food Chemistry**, v.103, p. 22-30, 2007.

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.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANSCHADEL, M.; BOSCHERT, V.; KRIPPNER-HEIDENREICH, A. Tumour Necrosis Factors. **Encyclopedia of Life**, p. 1-12, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos, aromatizantes/aromas. Resolução 104, de 14 de maio de 1999. **Regulamento técnico sobre aditivos, aromatizantes/aromas**. Brasília, maio de 1999.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. Manual de farmacologia e terapêutica. Porto Alegre:AMGH, 2010.

CABRAL, M. F. P.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Comportamento reológico da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) peneirada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, p-37-40, 2002.

CAMPESTRINI, L. *Aloe barbadensis* Miller: análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana. 203p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CAPASSO, F.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; Di CARLO, G.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; MASCOLO, N.; CASTALDO, S.; LONGO, R. Aloe and its therapeutic use. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. S124-S127, 1993.

CAPEK, P.; ALFÖLDI, J.; LIŠKOVÁ, D. An acetylated galactoglucomannan from *Picea abies* L. Karst. **Carbohydrate Research**, v. 337, 1033-1037, 2002.

CAPEK, P. A water soluble glucomannan isolated from as immunomodulatory active polysaccharide of *Salvia officinalis* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 356-359, 2009.

CAPEK, P.; MACHOVÁ, E.; TURJAN, J. Scavenging and antioxidant activities of immunomodulating polysaccharides isolated from *Salvia officinalis* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 75-80, 2009.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 252-257, 2006.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmed, 2004.

CASSON, N. A. Flow equation for pigment-oil suspensions of the printing ink type. In: MILL, C. C.. **Rheology of Disperse Suspensions**. New York: Pergamon Press, 1959.

CESCUTTI, P.; CAMPA, C.; DALBEN, F.; RIZZO, R. Structure of the oligomers obtained by enzymatic hydrolysis of the glucomannan produced by the plant *Amorphophallus konjac*. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2505-2511, 2002.

CESCUTTI, P.; IMPALLOMENI, G.; GAROZZO, D.; RIZZO, R. O-acetyl localization on Cepacian, the principal exopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex bacteria. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2905-2912, 2011.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology Review**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHEN, H.; ZHANG, M.; XIE, B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. **Food Chemistry**, v. 90, p. 17-21, 2005.

CHEN, R.; LIU, Z.; ZHAO, J.; CHEN, R.; MENG, F.; ZHANG, M.; GE, W. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*. **Food Chemistry**, v. 127, p. 434-440, 2011.

CHOW, J. T. N.; WILLIAMSON, D. A.; YATES, K. M.; GROUX, W. J. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.1131-1142, 2005.

CHUN-HUI, L.; CHANG-HAI, W.; ZHI-LIANG, X.; YI, W. Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 961-970, 2007.

CIVAS, A.; EBERHARD, P.; LE DIZET, P.; PETEK, F. Glycosidases induced in *Aspergillus tamari*. Secreted α -D-galactosidase and β -D-manannase. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 857-863, 1984.

COMMINS, P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. **Journal of Immunology**, v. 125, p. 53-72, 2010.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. **Food Chemistry**, v. 112, p. 587-594, 2009.

COULTER, J. A.; MCCARTHY, H. O.; XIANG, J.; ROEDL, W.; WAGNER, E.; ROBSON, T.; HIRST, D. G. Nitric oxide – A novel therapeutic for cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, p. 192-198, 2008.

CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Immunology**, v. 79, p. 408-411, 1993.

Da SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Bioactive polysaccharide from *Costus spicatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 239-242, 2003.

Da SILVA, B. P. PARENTE, J. P. Chemical properties and antiinflammatory activity of a galactomannoglucan from *Arecastrum romanzoffianum*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 109-112, 2010.

DAVIS, R. H.; KABBANI, J. M.; MARO, J. P. Wound healing and antiinflammatory activity of *Aloe vera*. **Proceedings of the Pennsylvania Academy of Science**, v. 60, p. 79, 1986.

DAVIS, R. H.; LEITNER, M. G.; RUSSO, J. M.; BRYNE, M. E. Anti-inflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. **Journal of the American Pediatric Medical Association**, v. 79, p. 263-276, 1989.

DEA, I. C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seeds galactomannans. **Advance Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p. 241-312, 1975.

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

De PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 177-181, 1995.

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

De VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus enzyme involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Molecular Biology Review**, v. 65, p. 497-522, 2001.

DEY, P. M. Biochemistry of plant galactomannans. **Advance Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 35, p. 431-376, 1978.

DIEHL, B.; TEICHMULLER, E. E. Aloe vera, quality inspection and identification. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 9, p. 14-16, 1998.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-2147, 1996.

DOLZ, M.; HERNANDEZ, M. J.; DELEGIDO, J. Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p-421-427, 2008.

DORE, C. M. P. G.; AZEVEDO, T. C. G.; De SOUZA, M. C. R.; REGO, L. A. R.; De DANTAS, J. C. M.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Antiinflammatory, antioxidante and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1160-1169, 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiology control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82 p. 47-95, 2002.

DU, X.; LI, J.; CHEN, J.; LI, B. Effect of degree of deacetylation on physicochemical an gelation properties of konjac glucomannan. **Food Research International**, v. 46, p. 270-278, 2012.

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

ERIKSSON, K. W.; WINELL, M. Purification and characterization of a fungal β -mannanase. **Acta Chemical Scandinavica**, v. 22, p. 1924-1934, 1968.

ESUA, M. F.; RAUWALD, J. W. Novel bioactive maloyl glucans from *Aloe vera* gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 355-364, 2006.

FDA – Food and Drug Administration. Listing of food additive status. Disponível em: <www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives>. Acesso em 03.05.2012.

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

FARKAS, A. Topical medicament including poliuronide derived from aloe. U.S. Patent. (1963) 3.103.466.

FEMENIA, A.; SÁNCHEZ, E. S.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999.

FEMENIA, A.; GARCÍA-PASCUAL, P.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 397-405, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, G. M. **Estudo das propriedades reológicas do sistema polpa de cupuaçu-biopolímeros**. 120p. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, 2008.

FERRY, J. **Viscoelastic Properties of Polymers**, 3 ed., Wiley: New York, 1980.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

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

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

FREITAS, R. A.; PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P. A.; ROCHA, S.; SIERAKOWSKI, M. R. Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilisssima*) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 3-8, 2004.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p.18515-18517, 1997.

GAO, S.; NISHINARI, K. Effect of deacetylation rate on gelation kinetics of glucomannan. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 38, p. 241-249, 2004.

GEHRKE, T. **Reometria de suco concentrado de suco de frutas**. 52p.Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas, 1996.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656-661, 2010.

GIBOREAU, A.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B. Rheological behavior of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. **Journal of Texture Studies**, v. 25, p-119-137, 1994.

GILBERT, H. F., McLEAN, V. Molecular and cellular aspects of thiol-disulphide Exchange. **Advance Enzimology**, v. 63, p. 169-172, 1990.

GILROY, D. W.; LIAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 3, p. 401-16, 2004.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, p.1212-1222, 1975.

GORDON, S. Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. **Cell**, v. 111, p. 927–930, 2002.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GOWDA, D. C.; NEELISIDDAIAH, B.; ANJANEYALU, Y.V. Structural studies pf polysaccharides from *Aloe vera*. **Carbohydrate Research**. v. 83, p. 402-405, 1979.

GOWDA, D. C. Structural studies of polysaccharides from *Aloe saponaria* and *Aloe vanbalenii*. **Carbohydrate Research**, v. 83, p. 402-405, 1980.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUN, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 16, p. 117-151, 1986.

GUANG, Y.; ZHANG, L.; CHIHIRO, Y.; IKUYA, M.; MIKI, I.; KUNIHICO, O. Blend membranes from cellulose/konjac glucomannan cuprammonium solution. **Journal of Membrane Science**, v. 139, p. 47-56, 1998.

GUEBITZ, G. M.; HAYN, M.; STEINER, W. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rofsii*: characterization and synergism of two endo- β -mannanases and β -mannosidase. **Bioresource and Technology**, v. 58, p. 127-135, 1996.

GUO. Q.; CUI, S. W.; WANG, Q.; GOFF, H. D.; SMITH, A. Microestructure and rheological properties of psyllium polysaccharide gel. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p.1542-1547, 2009.

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

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v. 25, p. 57-74, 1996.

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

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life Sciences. **Nature Publishing Group**, p. 1-7, 2001.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 531-542, 2009.

HAMINIUK, C. W. I. **Comportamento reológico e fracionamento péctico das polpas integrais de araçá (*Psidium cattleianum sabine*) e amora-preta (*Rubus spp*)**. 79p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HAMINIUK, C. W. I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MASSON, M. L. Rheological characterization of blackberry pulp. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, p-291-296, 2006.

HANNUKSELA, T.; PENHOAT, C. H. NMR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 301-312, 2004.

HERSCHEL, W. H.; BULKLEY, R. Konsistenzmessungen von Gummi-Benzollösungen, **Kolloid Zeitschrift**, v. 39, p.291-300, 1926.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p. 249-261, 1949.

HIROSE, M.; HAGIWARA, A.; HASUI, A.; INOUE, K.; ITO, N. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. **Cancer Letters**, v. 52, p. 169-174, 1986.

HOHMANN, H. P.; BROCKHAUS, M.; BAEUERLE, P. A.; REMY, R.; KOLBECK, R.; Van LOON, A. P. G. M. Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF- κ B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 22409-22417, 1990.

HOLDSWORTH, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v.2, p-393-418, 1971.

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

HRCKOVA, G.; VELEBNY, S. Treatment of toxocara canis infections in mice with liposome-incorporated bezimidazole carbamates and immunomodulator glucan. **Journal of Helminthology**, v. 75, p. 141-146, 2001.

HSIEH, Y. S. Y.; CHIEN, C.; LIAO, S. K. S.; LIAO, S. F.; HUNG, W. T.; YANG, W. B.; LIN, C. C.; CHENG, T. J. R.; CHANG, C. C.; FANG, J. M.; WONG, C. H. Structure and bioactivity of the polysaccharides in medicinal plant *Dendrobium huoshanense*. **Bioorganics & Medicinal Chemistry**, v. 16, 6054-6058, 2008.

HU, Y.; XU, J.; HU, Q. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7788-7791, 2003.

HUA, Y. F.; ZHANG, M.; FU, C. X.; CHEN, Z. H.; CHAN, G. Y. C. Structural characterization of a 2-O acetyglucomannan from *Dendrobium officinale* stem. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2219-222, 2004.

HUANG, L.; TAKAHASHI, R.; KOBAYASHI, S.; KAWASE, T.; NISHINARI, K. (2002). Gelation behavior of native and acetylated konjac glucomannan. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 1296-1303, 2002.

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

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 9-17, 2002.

IASC – International Aloe Science Council. Disponível em www.iasc.org. Acesso em 17/12/12.

IBARZ, A., GONÇALVES, C., EXPLUGAS, S. Rheology of clarified passion fruit juices. **Fruit Processing**, v. 6, p. 330-333, 1996.

IBARZ, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Operaciones unitarias em la ingeniería de alimentos**. Technomic. Publishing companing, Inc.: Pennsylvania. p. 85 – 204, 1999.

IM, S. A.; OH, S. T.; SONG, S.; KIM, M. R.; KIM, D. S.; WOO, S. S.; JO, T. H.; PARK, Y. I.; LEE, C. K. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 271-279, 2005.

ISHURD, O.; ZAHID, M.; AHMAD, V. U.; PAN, Y. Isolation and Structure analysis of a glucomannan from the seeds of libian dates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3772-3774, 2001.

ISHURD, O.; KERMAGI, A.; ELGHAZOUN, M.; KENNEDY, J. F. Structural of a glucomannan from *Lupinus varius* seed. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 410-413, 2006.

JACOBS, A.; PALM, M.; ZACCHI, G.; DAHLMAN, O. Isolation and characterization of water-soluble hemicellulose from flax shive. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1869-1876, 2003.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: O sistema immune na saúde e na doença**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed,. 2007.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDEBERG, B.; JÖNNGREN, J. A pratical guide to the metylation analysis of carbohydrates. **Chemical Communication**, v. 8, p. 1-71, 1976.

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

JONES, D. P. Radical-free biology of antioxidative stress. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 295, p. C849-C868, 2008.

KABEL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Mass determination of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry following HPLC, assisted by on-line desalting and automated sample handling. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p.161-165, 2001.

KANG, S. M.; KIM, K. N.; LEE, S. H.; AHN, G.; CHA, S. H.; KIM, A. D.; YANG, X. D.; KANG, M. C.; JEON, Y. J. Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 80-85, 2011.

KARACA, K.; SHARMA, J. M.; NORDGREN, R. Nitric oxide production by chicken macrophages activate by acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. **International Immunopharmacology**, v.17, p.183-188, 1995.

KASSUYA, C. A.; CREMONEZE, A.; BARROS, L. F. L.; SIMAS, A. S.; LAPA, F. R.; MELLO-SILVA, R.; STEFANELLO, M. E.; ZAMPRONIO, A. R. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 369-76, 2009.

KATSURAYA, K.; OKUYAMA, K.; HATANAKA, K.; OSHIMA, R.; SATO, T.; MATSUZAKI, K. Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ^{13}C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 183-189, 2003.

KAVANAGH, G. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterization of polymer gels. **Progress in Polymers Science**, v. 23, p. 533-562, 1998.

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

KETTER, B.; MEYER, D. J. Glutathione transferases: A possible role in the detoxication and repair of DNA and lipid hydroperoxides. **Mutation Research**, v. 214, p. 33-40, 1989.

KIM, H.S.; KACEW, S.; LEE, B. M. In vitro chemopreventive effects of plant polyssacharydes (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1637-1640, 1999.

KISHIDA, N.; OKIMASU, S.; KAMATA, T. Molecular weight and intrinsic viscosity on konjac glucomannan. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 42, p. 1645-1650, 1978.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: From basic science to medicine – 40 years in immunology. **Annual Review in Immunology**, v. 23, p. 1-21, 2005.

KLIMP, A. H.; de VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/hematology**, v. 44, p. 143-161, 2002.

KOLLECK, I.; SINHA, P.; RÜSTOW, B. Vitamin E as an antioxidant of the lung: mechanisms of vitamin E delivery to alveolar type II cells. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, p. 62-66, 2002.

KONDERA-ANASZ, K.; SIKORA, J.; MIELCZAREK-PALACZ, A.; JONÍCA, M. Concentrations of interleukin (IL)-1a, IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sRII) and IL-1receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.123, p.198-203, 2005.

KOOIMAN, P.; ADAMS, G. A. Constitution of a glucomannan from tamarack (*Larix laricina*). **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, p. 889-896, 1961.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAARANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drugs Targets – Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 471–479, 2005.

KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN. Inducible nitric oxide synthase in human disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 113, p. 147-156, 1998.

KUMAR, V. ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7. Ed. Guanabara-Koogan, 2007.

LAMBERT, J. B.; SHURVELL, H. F.; LIGHTNER, D. A.; COOKS, R. G. In: **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice-Hall: New Jersey, p. 151-250. 1998.

LARSEN, G. L.; HOLT, P. G. The concept of airway inflammation. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, v.162, p. S2-S6, 2000.

LEE, J. K.; LEE, M. K.; YUN, Y. P.; KIM, Y.; KIM, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, K.; HUANG, S.S.; LEE, C. K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1275-1284, 2001.

LEE, K. Y.; WEINTRAUB, S. T.; YU, B. P. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 261–265, 2000.

LEE, Y. L.; JIAN, S. Y.; LIAN, P. Y.; MAU, J. L. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 116–120, 2008.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **Glycobiology**, v. 14, p. 501-510, 2004.

LIPPACHER, A.; MULLER, R. H.; MADER, K. Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 561–567, 2004.

LIU, F.; NG, T. B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. **Life Sciences**, v. 66, p. 725-735, 2000.

LIU, F.; OOI, V. E. C.; CHANG, S. T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. **Life Sciences**, v. 60, p. 763-771, 1997.

LUNDQVIST, J.; TELEMAN, A.; JUNEL, L.; ZACCHI, G.; DAHLMAN, O.; TJERNELD, F. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (*Picea abies*). **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 29-39, 2002.

MABUSELA, W. T.; STEPHEN, A. M.; BOTHA, M. C. Carbohydrates polymers from *Aloe ferox* leaves. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3355-3558, 1990.

MacMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323–350, 1997.

MANDAL, M.; DAS, A. Structure of the D-galactan isolated from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**, v. 86, p. 247, 1980a.

MANDAL, M.; DAS, A. Structure of the glucomannan isolated from the leaves of *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**, v. 87, p. 249, 1980b.

MANICONE, A. M.; MCGURE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, p. 34-41, 2008.

MANNA, S.; McANALLEY, B. H. Determination of the position of the O-acetyl group is a β -(1,4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**, v. 241, p. 317-319, 1993.

MARCOCCI, I.; MARGUIRE, J. J. , DROY-LEFAIZ, M. T.; PACKER, L. The nitric oxide scavenging properties *Ginkgo biloba* extract. **Biochemical and Biophysical Research communication**, v. 201, p. 748-755, 1994.

MARINO, R. H.; EIRA, A. F.; KURAMAE, E. E.; QUEIROZ, E. C. Morphomeolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer strains in relation to luminosity and temperature of frutification. **Scientia Agricola**, v. 60, p.531-535, 2003.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae - Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 278, p. 96-103, 2007.

McCLEARY, B. V.; MATHESSEN, N. K. Action patterns and substrate-binding requirements of β -D-mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 119, p. 191-219, 1983.

McCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques**, CRC Press: Boca Raton. p. 378, 1999.

McCLEMENTS, J. **Food Biopolymers and Colloids Research Laboratory**. 2008. University of Massachusetts Amherst. Disponível em : <<http://www.unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Rheology.html>>. Acesso em : 06/02/2012.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-35, 2008.

MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. **Polymer Bulletin**, v. 14, p. 157-164, 1985.

MILLANE, R. P.; HENDRIXSON, T. L. Crystal structure of mannan and glucomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 245-251, 1994.

MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. **Polymer Bulletin**, v.14, p-157-164, 1985.

MILLER, G. L. Use of ninitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLS, P. L.; KOKINI, J. L. Comparison of steady shear and dynamic viscoelastic properties of Guar and Karaya gums. **Journal of Food Science**, v.49, p. 1-4, 1984.

MIMA, T.; NISHIMOTO, N. Clinical value of blocking IL-6 receptor. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 21, p. 224–230, 2006.

MINTER, R. M.; WESSELS, F. J.; MOLDAWER, L. L. Cytokine biology. **Surgical Research**, v. 67, p. 933-947, 2001.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, p. 164-169, 1999.

MORRIS, E. R. Polysaccharide Rheology and In-Mouth Perception. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 654 p, 1995.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 319-326, 1987.

NATHAN, C. F. Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2417-2423, 1997.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K. M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1745-1755, 2004.

NIEDUSZYNSKI, I.; MARCHESSAULT, R. H. The cristaline structure of poly-B-D(1→4) manose: mannan I. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 50, p. 2130-2138, 1972.

NISHIMIKI, M.; RAO, N.A.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 46, p. 849–853, 1972.

NISHINARI K.; ZHANG, H. Recent advance in the understanding of heat set gelling polysaccharides. **Trends in Food Science Technology**, v.15, p. 305-312, 2004.

OHYA, Y.; IHARA, K.; JUN-ICHI, M.; TOMOKO, S.; TATSURO, O. Preparation and biological properties of dicarboxy-glucomannann: enzymatic degradation and stimulating activity against cultured macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p.123-130, 1994.

OKAMURA, N.; HINE, N.; HARADA, S.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; YAGI, A. Three chromone components from *Aloe vera* leaves. **Phytochemistry**, v. 43, p. 495-498, 1996.

OOSTERVELD, A.; BELDMAN, G.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M. J. F.; VORAGEN, A. G. J. Effect of enzymatic deacetylation on gelation of sugar beet pectin in the presence of calcium. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 249-256, 2000.

OPAZO-NAVARRETE, M.; TABILO-MUNIZAGA, G.; VEGA-GÁLVEZ, A.; MIRANDA, M.; PÉREZ-WON, M. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the rheological properties of *Aloe vera* suspensions (*Aloe barbadensis* Miller). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, *in press*, 2012.

OSTWALD, V. W. Ueber die rechnerische Darstellung des Strukturgebietes der Viskosit it. **Kolloid Zeitschrift**, v. 47, p.176-187, 1929.

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. 307-315, 1986.

PAEZ., A.; GEBRE, G. M.; GONZALEZ, M. E.; TSCHAPLINSKI, T. J. Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exponed to three irradiance levels. **Enviromental and Experimental Botany**, v. 44, p. 133-139, 2000.

PAULSEN, B. S.; FAGERHEIM, E.; ØVERBYE, E. Structural studies of the polysaccharide from *Aloe plicatilis* Miller. **Carbohydrate Research**, 60, 345-351, 1978.

PENROJ, P.; MITCHELL, J. R.; HILL, S. E.; GANJANAGUNCHORN, W. Effect of konjac glucomannan deacetylation on the properties of gels formed from mixtures of kappa carragenan and konjac glucomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 367-376, 2005.

PETERS, V. A.; JOESTING, J. J.; FREUND, G. G. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. **Brain, Behavior and Immunity**, *In press*, 2012.

PETKOWICZ, C. L. O.; SHAEFFER, S.; REICHER, F. The mannan from *Schizolobium parahybae* is not a reserve polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 659-664, 2007.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for cell viability. In: KRUSE, Jr. P. F.; PATTERSON, Jr. M. K. **Tissue culture: methods and application**. New York: Academic Press, p.406-408, 1973.

PIERRE, J. L.; FONTECAVE, M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. **BioMetals**, v. 12, p. 195-199, 1999.

PIPPEN, E. L.; MCCREADY, R. M.; OWENS, H. S. (1950). Gelation properties of partially acetylated pectins. **Journal of American Chemistry Society**, v. 72, p. 813-816, 1950.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Review in Immunology**, v. 9, p. 259-270, 2009.

POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y. U.; OVODOVA, R. G.; OVODOV, Y. U. S. Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 281-287, 2005.

PRASHANTH, M. R. S.; PARVATHY, K. S.; SUSHEELAMMA, N. S.; PRASHANTH, K. V. H.; CHA, A.; ANILKUMAR, G. Galactomannan esters – A simple, cost-effective method of preparation and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1198-1205, 2006.

PREHN, P. Methylation of carbohydrates by methyl trifluoromethanesulfonate in trimethyl phosphate. **Carbohydrate Research**, v. 78, p. 372-374, 1980.

PRYOR W. A. Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes, and reactions. **Annual Review of Physiology**, v. 48 p. 657-667, 1986.

PUGH, N.; ROSS, S. A.; ELSOHL, M. A.; PASCO, D. S. Characterization of aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1030-1034, 2001.

QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F.; SILVA, C. L.; MATA, E. R. M. C. Comportamento reológico de méis de florada de silvestre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 190-194, 2007.

RADJABI-NASSAB, F.; RAMILIARISON, C.; MONNERET, C.; VILKAS, E. Further studies of the glucomannan from *Aloe vahombe* (liliaceae) II. PARTIAL HYDROLYSES AND NMR ¹³C STUDIES. **Biochimie**, v. 66, p. 563-567, 1984.

RADJABI, F.; AMAR, C.; VILKAS, E. Structural studies of the glucomanannan from *Aloe vahombe*. **Carbohydrate Research**, v. 116, p. 166-170, 1983.

RAMAMOORTHY, L.; KEMP, M. C.; TIZARD, I. R. Acemannan, a β -(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264. **Molecular Pharmacology**, v. 50, p. 878-884, 1996.

RAO, M. A., COOLEY, H. J. Applicability of flow models with yield for tomato concentrates. **Journal of food process engineering**, v. 6, p. 159-173, 1982.

RAO, M.A. **Propriedades Reológicas dos Alimentos**. Curso de Atualização do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo, 1996.

RAO, M. A.; TATTIYAKUL, J. Granule size and rheology behaviour heated tapioca starch dispersions. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 123-132, 1999.

RATCLIFFE, I.; WILLIAMS, P. A.; VIEBKE, C.; MEADOWS, J. Physicochemical characterization of konjac glucomannan. **Biomacromolecules**, v. 6, p-1977-1986, 2005.

REESE, T.; SHIBATA, Y. β -Manannases on fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 11, p. 167-183, 1965.

REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H. III; WORSTER, P. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 55, p. 803-808, 1998.

REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 3-37, 1999.

RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G. ; HAAN, L.; SPENKELINK, B; AWAD, H. M.; CNUBBEN, N. H. P.; ZANDEN, J. J; WOUDE, H.; ALINK, G. M.; KOEMAN, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Enviromental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 321-333, 2002.

RINCÓN, F.; MUÑOZ, J.; LÉON DE PINTO, G.; ALFARO, M. C.; CALERO, N. Rheological properties of *Cedrella odorata* gum exudate aqueous dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1031-1037, 2009.

ROBOZ, E.; HAAGEN-SMITH, M. A mucilage from *Aloe vera*. **Journal American Chemical Society**, v. 70, p. 3248, 1948.

RODRIGUEZ, JD.; HERNANDEZ-CASTILLO, D.; RODRIGUEZ-GARCIA, R.; ANGULO-SANCHEZ, J.L. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 81-87, 2005.

RODRIGUES-GONZÁLEZ, V. M.; FEMENIA, A.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; CANDELAS-CADILLO, M. G.; RAMÍREZ-BACA, P.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1675-1683, 2011.

RONCA, F.; PALMIERI, L.; PANICUCCI, P.; RONCA, G. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 6, p. 14-21, 1998.

ROSARIO, M. M. T. **Obtenção e aplicação de xiloglucanas em testes sobre macrófagos peritoneais de camundongo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SACCÙ, D.; BOGONI, P.; PROCIDA, G. Aloe exudates: Characterization by reverse phase HPLC and headspace CG-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4526-4530, 2001.

SANTOS NETO, M. **Avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antipirética do extrato hidroalcóolico bruto de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger em ratos**. Dissertação (Mestrado em Gestao, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmaceutica) – Universidade Catolica de Goias, Goiânia, 2009.

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.

SEGAL, A.; TAYLOR, J. A.; EOFF, J. C. A re-investigation of the polysaccharide material from *Aloe vera* mucilage. **Lloydia**, v. 41, p. 423, 1968.

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

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos**. 2. Ed. Artliber Editora Ltda: São Paulo, 2006.

SENGKHAMPARN, N.; SAGIS, L. M. C.; DE VRIES, R.; SCHOLS, H. A.; SAJJAANANTAKUL, T.; VORAGEN, A. G. J. Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 35–41, 2010.

SHARIFIFAR, F.; DEHGHN-NUDEH, G.; MIRTAJALDINI, M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. **Food Chemistry**, v. 112, p. 885-888, 2009.

SHARMA, S. K., MULVANEY, S. J., RIZVI, S. S. H. **Food processing engineering : theory and laboratory experiments**. United States of America : Wiley-Interscience. 348p, 2000.

SHEETS, M. A.; UNGER, B. A.; GIGGLEMAN, G. F.; TIZARD, I. R. Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. **Molecular biotherapy**, v. 3, p. 41-45, 1991.

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

SHIMAHARA, H.; SUZUKI, H.; SUGIYAMA, N.; ANDOH, T.; NISIZAWA. Partial purification of β -mannanase from the konjac tubers and their substrate specificity in relation to the structure on konjac glucomannan. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, p. 293-299, 1975.

SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorate* in submerged culture. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 39, p. 1-8, 2008.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 101, p. 10-19, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p.213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315-1321, 1995.

SILVA JÚNIOR, A. **Essentia herba – Plantas bioativas**. Florianópolis: EPAGRI. V1. p. 120-148, 2003.

SILVA, G. B.; IONASHIRO, M.; CARRARA, A. C.; CRIVELLARI, A. C.; TINÉ, M. A. S.; PRADO, J.; CARPITA, N. C.; BUCKERIDGE, M. S. Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich type III cell wall in *Adiantum raddianum*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2352-2360, 2011.

SIMAS-TOSIN, F. F.; BARRAZA, R. R.; PETKOWICZ, C. L. O.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SANTOS, E. M. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Rheological and structural characteristics of peach tree gum exudate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 486-493, 2010.

SIMÕES, J.; NUNES, F. M.; DOMINGUES, P.; COIMBRA, M. A.; DOMINGUES, M. R. Mass spectrometry characterization of an *Aloe vera* mannan presenting immunostimulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 229-236, 2012.

SIMS, I. M.; CRAIK, D. J.; BACIC, A. Structural characterization of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 79-92, 1997.

SINGH, V.; MALVIYA, T. A non-ionic glucomannan from the seeds of an indigenous medicinal plant: *Bryonia lactinosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 481-483, 2006.

SMIRNOVA, N. I.; MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. The structure and characteristics of glucomannans from *Eremus iae* and *E. zangezurus*: assignment of acetyl group localization in macromolecules. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, p. 287-291, 2001.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOARES, A. A.; SOUZA, C. G. M.; DANIEL, F. M.; FERRARI, G. P. COSTA, S. M. G.; PERALTA, R. M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 112, p. 775-781, 2009.

SONG, J. Y.; HAN, S. K.; EH, P. V. O.; YUN, Y. S. YI, S. Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 857-865, 2002.

SONG, H. F.; ZHANG, Q. B.; ZHANG, Z. S.; WANG, J. *In vitro* antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Bryopsis plumosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 1057-1061, 2010.

SOUTHORN, P. A. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 381-389, 1988.

SOUZA, A. C. G. Efeito antioxidante de uma nova classe de compostos teluroacetilenos: estudos *in vitro* e *in vivo*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SOUZA, M. C. R.; MARQUES, C. T.; DORE, C. M. G.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O. LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 153-160, 2007.

STAHL, P.; SCHLESINGER, P. H.; SIGARDSON, E.; RODMAN, J. S.; LEET, Y. C. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: Characterization and evidence for receptor recycling. **Cell**, v. 19, p. 207-215, 1980.

STAHL, E. **Thin Layer Chromatography – A Laboratory Handbook**. Springer-Verlag, Berlin, 1965.

STANĚK, J.; ČERNÝ, M.; PACÁK, J. **The oligossacarides**. Academic Press Inc: New York. 567p, 1965.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, 2 ed. East Lansing: Freeman Press, 1996.

STENVINKEL, P.; KETTELER, M.; JOHNSON, R. J.; LINDHOLM, B.; PECOITS-FILHO, R.; RIELLA, M.; HEIMBÜRGER, O.; CEDERHOLM, T.; GIRNDT, M. IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. **Kidney International**, v. 67, p. 1216–1233, 2005.

STOOKEY, L. L. Ferrozine – A new spectrometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, p. 779-781, 1970.

STORN, D.R.; ROSENTHAL, K.S.; SWANSON, P.E. polymyxin and related peptide antibiotics. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 46, p. 723-763, 1977.

STRIETER, R. M.; REMICK, D. G.; WARD, P. A.; SPENGLER, R. N.; LYNCH, J. P.; LARRICK, J.; KUNKEL, S. L. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor α production by pentoxifylline. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 155, p. 1230-1236, 1988.

STUART, R. W.; LEFKOWITZ, D. L.; LINCOLN, J. A.; HOWARD, K.; GELDERMAN, M. P. Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant *acemannan*. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, p. 75-82, 1997.

SUGIYAMA, N.; SHIMAHARA, H.; ANDOH, T.; TAKAMOTO, M.; Mannan and related compounds II. Konjac-mannanase from the tubers of *Amorphophallus konjac*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 1, p. 9-17, 1973.

SUN, J; ZHANG, X; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, v. 3, p. 276-284, 2003.

SYMONS, J. A.; YOUNG, P. R.; DUFF, G. W. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 β precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.1714-1718, 1995.

TABILO-MUNIZAGA A, BARBOSA-CANOVAS G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p.147–156, 2005.

TALMADGE, J.; CHAVEZ, J.; JACOBS, L.; MUNGER, C.; CHINNAH, T.; CHOW, J. T.; WILLIAMSON, D.; YATES, K. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1757-1773, 2004.

TAKIGAMI, S. **Konjac mannan**, In Handbook of Hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Cambridge:Woodhead Publishing Ltd., 2000.

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

TELEMAN, A.; NORDSTRÖM, M.; TENKANEN, M.; JACOBS, A.; OLOF, D. Isolation and characterization of o-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 525-534, 2003.

TENKANEN, M. Action of *Trichoderma resei* and *Aspergillus oryzae* esterases in the deacetylation of hemicelluloses. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 27, p. 19-24, 1998.

TOLEDO, R. T. **Fundamentals of Food Process Engineering**. New York: Chapman & Hall. 1991.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, p. 181-204, 2005.

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

TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBCLEISCH, J.; ENSLEY, H. E.; BROWDE, I. W.; WILLIAMS, D.L. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 393–402, 2001.

TSCHOEGL, N. **The Phenomenological Theory of Linear Viscoelasticity**. Berlin:Springer-Verlag, 1989.

TURNER, C. C.; WILLIAMSON, D. A.; STROUD, P. A.; TALLEY, D. J. Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1727-1737, 2004.

TURKOGLU, A.; DURU, M. E.; MERCAN, N.; KIVRAK, I.; GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, v. 101, p. 267-273, 2007.

Missouri Botanical Garden. Disponível em www.mobot.org. Acesso em 15/12/2012.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN HAZENDONK, J.; REINERINK, E. J. M.; WAARD, P.; VAN DAM, J. E. G. Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.). **Carbohydrate Research**, v. 291, p. 141-154, 1996.

VAZQUEZ, B.; AVILA, G.; SEGURA, D.; ESCALANTE, B. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 69-75, 1996.

VIDAL, J.R.M.B. **Comportamento reológico da polpa de manga (*Mangífera indica* L. Keitt)**. 159p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

VILKAS, E.; RADJABI-NASSAB, F. The glucomannans system from *Aloe vahombe* (liliaceae). III. Comparative studies on the glucomannan components isolated from leaves. **Biochimie**, v. 68, p. 1123-1127, 1986.

VINAY, D. S.; KWON, B. S. TNF superfamily: Costimulation and clinical applications. **Cell Biology International**, v. 33, p. 453-465, 2009.

VISUTHIKOSOL, V.; SUKWANARAT, Y.; CHOWCHUEN, B.; SRIURAITANA, S.; BOONPUCKNAVIG, V. Effect of *Aloe vera* gel to healing of burn wound a clinical and histological study. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 78, p. 403-409, 1995.

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

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 312-317, 2010.

VRIESMANN, L. C.; AMBONI, R. D. M. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1173-1181, 2011.

WALLER, G. R.; MANGIAFICO, S.; RITCHEY, C. R.; A chemical investigation of *Aloe barbadensis* Miller. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 58, p. 69-76, 1978.

WALLER, T. A.; PELLE, R. P.; STRICKLAND, F. M. *Industrial processing and quality control of Aloe barbadensis (Aloe vera) gel*. In: **Aloes-The Genus Aloe**. Boca Raton: CRC press. 2004.

WALTER, R. H. **Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food**. San Diego: Academic Press, 1998.

WANG, Y. T.; STRONG, K. J. Monitoring physical and chemical properties of freshly harvested field-grown *Aloe vera* leaves. A preliminary report. **Phytoterapy Research**, v. 7, p. S1-S4, 1993.

WARD, R. J.; PETERS, T. J. Free Radicals. In: Marshall, W. J.; Bangert, S. K. (Ed). **Clinical Biochemistry: Metabolic and clinical aspects**. Churchill Livingstone: New York, 1995. p. 765-777.

WEIGERT, A.; JENNEWEIN, C.; BRÜNE, B. The liaison between apoptotic cells and macrophages--the end programs the beginning. **Biological Chemistry**, v. 390, p. 379-90, 2009.

WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytotopharmaceuticals**. Stutgard: Medpharma Scientific Publishers, 2004. p. 25-29.

WILLFÖR, S.; REHN, P.; SUNDBERG, A.; SUNDBERG, K.; HOLMBOM, B. Recovery of water-soluble acetylgalactoglucomannan from mechanical pulp of spruce. **Tappi Journal**, v. 2, p. 27-32, 2003.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK, G. A.; SHIN, E.; KIM, S.; JO, T. H.; JONES, K. N.; MATULKA, R. A. Safety studies conducted on a proprietary high-purity *Aloe vera* inner leaf fillet preparation, Qmatrix®. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 57, p. 90-98, 2010.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenan-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, 1963a. p. 65-68.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York: Academic Press, 1963b. p. 211-215.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva, 1999. v. 1, p. 33-49.

WOZNIEWSKI, T.; BLASCHEK, W.; FRANZ, G. Isolation and structural analysis of a glucomannan from the leaves of *Aloe arborescens* var. Miller. **Carbohydrate Research**, v. 198, p. 387-391, 1990.

WU, J. H.; XU, C.; SHAN, C. Y.; TAN, R. X. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. chinensis. **Life Sciences**, v. 78, p. 622 – 630, 2006.

XIONG, S. L.; LI, A.; HUANG, N.; LU, F.; HOU, D. Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 1273-1280, 2011.

XU, C.; WILLFÖR, S.; HOLMLUND, P.; HOLMBOM, B. Rheological properties of water-soluble spruce O-acetyl galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 498-504, 2009.

YACHIDA, Y.; TSCUCHIHASHI, K.; GASA, S. Novel di-O-acetylated GM3s from equine erythrocytes, one containing 4,9-di-O-acetyl-N-glycolylneuraminic acid and another containing 4-O-acetyl-N-glycolylneuraminic acid and 6-O-acetyl-D-galactose. **Carbohydrate Research**. v. 298, p. 201-212, 1997.

YAMAZAKI, N.; SINNER, M.; DRIETRICH, H. H. Isolation and properties of β -1,4-manannase from *Aspergillus niger*. **Holzforschung**, v. 4, p. 101-109, 1976.

YARON, A. Characterization of *Aloe vera* gel before and after autodegradation, and stabilization of the natural fresh gel. **Phytotherapy research**, v. 7, p. S11-S13, 1993.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; CHUANG, D. Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrones. **Food Chemistry**, v. 70, p. 437-441, 2000.

YIN, W. C.; ZHANG, H. B.; HUANG, L.; NISHINARI, K. Effects of the lyotropic series salts on the gelation of konjac glucomannan in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 68-78, 2008.

YOU GUO, C.; ZONG LI, S.; XIAO PING, C. Modulatory effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on serum antioxidant enzymes activities in ovarian cancer rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 258-262, 2009.

YU, B. P. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 139-162, 1994.

YU. Z. H.; JIN, C.; XIN, M.; JIANMIN, H. Effect of Aloe vera polysaccharide on immunity and antioxidant activities in oral ulcer animal models. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 307-311, 2009.

YUAN, H.; ZHANG, W. LI, X.; LÜ, X.; LI, N.; GAO, X.; SONG, J. Preparation and in vitro antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 85–690, 2005.

YUN, C. H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; GAJADHAR, A. A.; REDMOND, M. J.; LAARVELD, B. β -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4) oat glucan enhances resistance to *eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. **International Journal of Parasitology**, v.27, p. 329-337, 1997.

YUSUF, S.; AGUNU, A.; DIANA, M. The effect of *Aloe vera* A. Berger (Liliaceae) on gastric secretion and acute gastric mucosal injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 33-37, 2004.

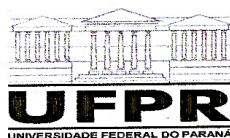
ZHANG, L.; TIZARD, I. R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. **Immunopharmacology**, v. 35, p. 119-128, 1996.

ZHANG, Q. F.; ZHANG, Z. R.; CHEUNG, H. Y. Antioxidant activity of *Rhizoma Smilacis Glabrae* extracts and its key constituent-astibilin. **Food Chemistry**, v. 115, p. 297-303, 2009.

ZHANG, Y.; XIE, B.; GAN, X. Advance in applications of konjac glucomannan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 27-31, 2005.

ZHANG, Z.; JIN, J.; SHI, L. Antioxidant activity of the derivatives of polysaccharide extracted from a Chinese medical herb (*Ramulus mori*). **Food Science and Technology Research**, v. 14, p. 160-168, 2008.

ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 489

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

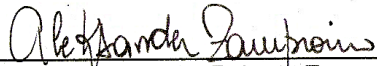
PROCESSO: 23075.041511/2010-93

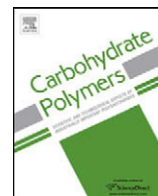
APROVADO: 09/11/2010 – R.O. 10/2010

TÍTULO: Estrutura química e atividades biológicas de polissacarídeos e oligossacarídeos obtidos de *Aloe barbadensis* Miller

AUTORES: Miguel Daniel Nosedá, Luciano Henrique Campestrini, Juliana Bello Maurer, Fabiola Regina Stevan-Hancke, Selma Faria Zawadzki Baggio, Cândida Aparecida Leite Cassuya, Raquel Moreira Lenzi, Maria Eugênia Duarte R. Nosedá

DEPARTAMENTO: Bioquímica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEEA



NMR and rheological study of *Aloe barbadensis* partially acetylated glucomannan

L.H. Campestrini, J.L.M. Silveira, M.E.R. Duarte, H.S. Koop, M.D. Nosedá*

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, P.O. Box 19046, CEP 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2012

Received in revised form

20 December 2012

Accepted 13 January 2013

Available online xxx

Keywords:

Aloe barbadensis

Partially acetylated glucomannan

Chemical structure

Rheology behavior

Aloe polysaccharide

Aloe pulp

ABSTRACT

The structural and rheological properties of the *Aloe* extract (AE) and the polysaccharidic fraction (PF) obtained from the leaves pulp of *Aloe barbadensis* Miller were investigated. Structural analyses carried out by composition, methylation analysis and NMR spectroscopy showed that PF is mainly constituted by a partially acetylated 4-linked β -D-glucomannan. The acetyl groups are located at C-2, C-2 and C-3, C-3 and/or C-6. The acetylation pattern of this type of polysaccharide was for the first time established using bidimensional NMR analyses. AE and PF aqueous solutions at 25 °C showed a non-Newtonian behavior (with pseudoplastic characteristics), however PF showed higher apparent viscosity than AE. Dynamic oscillatory analyses showed that both samples, at the same concentration, behaved as a concentrated solution. PF presented higher values of G' compared with those of AE and this behavior could be consequence of its higher content in partially acetylated glucomannan.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plants from genus *Aloe*, as *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera* L.), are adapted to grow in areas of low water availability and are characterized by possessing a large water storage tissue (Burdock, 1997; Ni, Turner, Yates, & Tizard, 2004). The inner central area of the leaves (leaf pulp) contains parenchymal cells that produce a clear slightly viscous (mucilaginous) fluid known as *Aloe* pulp and several other terminologies as for example inner gel, leaf parenchyma (Ni et al., 2004) and inner leaf file (Williams et al., 2010).

Glucomannans are the mayor polymeric constituents present in *Aloe* pulp and are mainly build up of 4-linked β -D-mannopyranosyl units besides minor amounts of 4-linked β -D-glucopyranosyl units. Differences in the mannose to glucose ratio (2.8–1 to 22.0–1), acetyl groups content (1.1–25%) and position of this substituent along the mannose backbone have been reported (Chow, Williamson, Yates, & Goux, 2005; Gowda, Neelisiddaiah, & Anjaneyalu, 1979; Gowda, 1980; Mandal & Das, 1980b; Manna & McAnalley, 1993; Paulsen, Fagerheim, & Øverbye, 1978; Wozniowski, Blaschek, & Franz, 1990). The presence of side chains of α -galactose (Chow et al., 2005), mannose (Mandal & Das, 1980b), and α -D-galactose and α -L-arabinose residues (Simões, Nunes, Domingues, Coimbra, & Domingues, 2012) as well as differences in molecular weight have also been reported (Gowda et al., 1979; Mandal & Das, 1980b; Reynolds & Dweck, 1999; Wozniowski et al., 1990). Additionally,

other polysaccharides have been isolated from *Aloe* pulp such as galactan, arabinan, pectin (Mandal & Das, 1980a, 1980b), acidic arabinogalactan (Wozniowski et al., 1990) and arabinorhamnogalactan (Mabusela, Stephen, & Botha, 1990).

Many biological activities, including anti-viral, anti-bacterial, laxative, protection against radiation, anti-inflammation, anti-oxidant and immunostimulation have been attributed to this plant, in particular, its polysaccharides (Chun-hui, Chang-hai, Zhi-liang, & Yi, 2007; Ni et al., 2004; Reynolds & Dweck, 1999). *Aloe* extract has been used topically as healing agent for burns, dermal ulcer, wounds and frostbite (Boudreau, Olson, Pogribna, Pogribny, & Beland, 2005; Somboonwong, Jariyapongskul, Thanamitramanee, & Patumraj, 2000; Visuthikosol, Sukwanarat, Chowchuen, Sriuraitana, & Boonpucknavig, 1995).

The rheological properties of the aqueous fluid from the pulp of *A. barbadensis* Miller grown in Negev region of Israel (Yaron, 1993) and Coquimbo, Chile (Opazo-Navarrete, Tabilo-Munizaga, Vega-Gálvez, Miranda, & Pérez-Won, 2012) were investigated. Yaron (1993) proposed that the fresh viscous fluid from *Aloe* presents pseudoplastic behavior, however Newtonian flow properties were obtained after storage of the mucilage at room temperature or incubation at 40 °C for 48 h. Opazo-Navarrete et al. (2012) reported that *Aloe* solution behaves as a solid ($G' > G''$) during storage at 4 °C.

The products obtained from *A. barbadensis* are frequently submitted to different types of processing, e.g. heating or dehydration, which may irreversible modified characteristics of the polysaccharide structures such as degree of acetylation, molecular weight and removal of side chains. These modifications could originate changes

* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1663; fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: mdn@ufpr.br (M.D. Nosedá).

Table 1

Yields, chemical analyses and monosaccharide composition of the *Aloe* extract (AE) and polysaccharidic fraction (PF) obtained from *Aloe barbadensis* Miller.

	Sample ^a	
	AE	PF
Yield (%) ^b	61.8	23.4
Carbohydrate (%) ^c	79.8	79.2
Protein (%) ^c	5.7	1.3
Acetyl (%) ^c	9.2	18.4
Monosaccharides (mol%) ^d		
Rha	3.5	tr. ^e
Ara	2.6	tr.
Man	28.7	94.2
Glc	60.7	3.9
UA	4.5	1.9

^a Samples defined in text.

^b Yield based on freeze-dried leaf pulp.

^c Carbohydrate, protein and acetyl are given in percentage of samples AE and PF.

^d Rha corresponds to rhamnose, Ara to arabinose, Man to mannose, Glc to glucose and UA to uronic acid.

^e Percentages less than 1.5% are considered as traces.

in the biological activities and rheological behavior of these polymers (Femenia, García-Pascual, Simal, & Rosselló, 2003).

The aim of this study was to determine the chemical structure and rheological behavior of the pulp extract and polysaccharidic fraction obtained from the leaves of *A. barbadensis* Miller cultivated in the southern region of Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of *Aloe* pulp extract (AE) and the polysaccharidic fraction (PF)

Leaves of *A. barbadensis* (10 kg) were collected from the organic farm Naturama Sucos Integrals do Brasil (Santa Catarina State, southern region of Brazil). After removing the bark and the exudate the inner central area of the leaves (leaf pulp) was crushed and centrifuged at 9800 × g, during 30 min, at 25 °C. The resulting supernatant was freeze-dried to afford the crude *Aloe* pulp extract AE. To obtain the PF fraction, the supernatant was submitted to EtOH precipitation (6 vol.) and maintained for 24 h, at 4 °C. The precipitate, obtained by centrifugation, was dissolved with water and dialyzed against distilled water. After a second EtOH precipitation and centrifugation the precipitate was dried in an oven at 40 °C during 24 h and milled (particle size of 200 mesh) to give the polysaccharidic fraction, PF (Table 1).

2.2. General procedures

Protein was determined according to the method of Bradford (1976). Total carbohydrate was determined according to the phenol–sulphuric method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956) and reducing sugar by the colorimetric method of Miller (1959). Uronic acid content was estimated through the *m*-hydroxybiphenyl method (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991), using glucuronic acid as a standard. Acetyl groups were quantified according to the colorimetric method of Hestrin (1949). The degree of substitution (DS) of the mannose residues by acetyl groups was calculated using the formula reported by Xu et al. (2010).

2.3. Monosaccharide composition and methylation analyses

For the monosaccharide composition fractions were hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid (TFA) for 3 h at 120 °C, followed by sodium borohydride (NaBH₄) reduction (Wolf from & Thompson,

1963a), and acetylation with acetic anhydride for 1 h at 120 °C (Wolf from & Thompson, 1963b). The resulting alditol acetates were analyzed by GC–MS and identified by their typical electron-impact breakdown profiles and retention times (Jansson, Kenne, Liedgren, Lindberg, & Lönnegren, 1976). Methylation analysis was carried out as described by Ciucanu and Kerek (1984). Briefly, the dry sample (15 mg) was dissolved in Me₂SO (1 mL), and powdered NaOH (30 mg) was added. After 30 min under magnetic stirring at 25 °C, CH₃I (0.1 mL) was added, and the reaction was allowed to proceed for 30 min. Except by the Me₂SO addition, the above mentioned process was repeated twice and the reaction was interrupted by addition of water (2 mL) and neutralized with 50% aq. AcOH. The methylation products were dialyzed against distilled water, freeze-dried and submitted to more two steps of methylation in the same way as described above. The resulting partially *O*-methylated alditol acetates were analyzed by GC–MS and identified by their typical electron-impact breakdown profiles and retention times (Jansson et al., 1976).

GC–MS analyses were performed using a Varian 3800 chromatograph connected to a Varian Saturn 2000R ion-trap spectrometer, using He as carrier gas at a flow rate of 1 mL min^{−1}. A DB-225 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., J&W) was used applying a linear temperature gradient from 50 to 215 °C at 40 °C min^{−1} for quantitative analysis of alditol acetates and partially *O*-methylated alditol acetates.

2.4. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR spectroscopic analyses were carried out using a Bruker AVANCE™ III 400 NMR spectrometer (Bruker BioSpin Corporation, Rheinstetten, Germany) equipped with a 5 mm inverse probe, at 65 °C. ¹H, ¹³C and ¹³C–DEPT acquisition parameters were previously reported (Ascêncio, Orsato, França, Duarte, & Nosedá, 2006). 2D ¹H, ¹H COSY, and ¹H, ¹³C HSQC experiments were carried out using the pulse programs supplied with the Bruker manual. Samples were solubilized in D₂O at 30 and 15 mg mL^{−1} for ¹³C and ¹H, respectively. Chemical shifts (in ppm) are expressed relative to an internal acetone standard at 30.2 and 2.224 ppm for ¹³C and ¹H NMR spectra, respectively.

2.5. HPSEC/MALLS/RI analyses

High pressure size exclusion chromatography (HPSEC) analyses of AE and PF fractions were carried out on a Waters chromatograph equipped with four Ultrahydrogel columns (2000, 500, 250, 120, molecular weight range from 7 × 10⁶ to 1 × 10² Da; Milford, MA, USA) connected in series, and attached to the multidetection system, which consisted of a Waters 2410 differential refractometer (RI) detector (Milford, MA, USA) and a Wyatt Technology Dawn F multiangle laser light scattering (MALLS) detector (Santa Barbara, CA, USA) adapted on-line. The mobile phase consisted of a 0.1 mol L^{−1} NaNO₂ solution containing 0.5 g L^{−1} NaN₃ at a flow rate of 0.6 mL min^{−1}. Samples were solubilized in 0.1 mol L^{−1} NaNO₂ solution containing NaN₃ (0.5 g L^{−1}) overnight under magnetic stirring, at room temperature. The samples (1 mg mL^{−1}) previously filtered (0.22 μm, Millipore, Billerica, MA, USA), were injected in the equipment and analyzed at 25 °C. HPSEC–MALLS–RI data were collected and analyzed by a Wyatt Technology ASTRA program. The molar mass (Mw) of PF was determined according to Freitas, Busato, Mitchell, and Silveira (2011). The *dn/dc* value for the peak eluted at 38 min, was determined as 0.118 mL g^{−1}, using 0.1 M NaNO₂ as the solvent at 25 °C.

2.6. Preparation of samples for rheological analysis

AE and PF were solubilized in deionized water at concentrations of 0.1, 0.2 and 0.3 g L⁻¹ (w/w) under mechanical stirring for 12 h at 25 °C.

2.7. Rheological measurements

Rheological measurements were performed using a RheoStress 1 rheometer (Haake GmbH, Germany) coupled to a circulating Haake DC30 bath. All analyses were carried out at 25 °C using a PP35-Ti sensor (plate and plate geometry, diameter 35 mm).

Flow curves in the CR mode (controlled shear rate) were performed from 0.1 to 300 s⁻¹, during 300 s, where the coefficient of determination R^2 was used as a parameter for the choice of the adopted rheological model (Techawipharat, Suphantharika, & BeMiller, 2008). Mechanical responses of the samples were determined by subjecting them to dynamic frequency sweep (0.01–10 Hz) within the linear viscoelastic region (obtained by strain sweep tests at 1 Hz). The mechanical spectra were characterized by values of G' and G'' (Pa) as a function of frequency (f). G' is the storage modulus, related to the solid response of the material and G'' is the loss modulus, related to the fluid response of the material. “Creep and recovery” tests were carried out for 300 s to creep and 300 s to recovery at 25 °C, at 1 Pa tension. RheoWin 3 Data Manager and ORIGINPRO 8.0 softwares were used to analyze and process the rheological results, respectively. All experiments were performed at least in duplicate and the results are the average values.

3. Results and discussion

3.1. Yields and chemical analysis of AE and PF fractions

From the leaf pulp of *A. barbadensis* we isolated the crude extract (AE) that after ethanolic precipitations gave rise to the polysaccharidic fraction (PF). Table 1 shows yields, chemical analyses and monosaccharide composition of these fractions. The yields for AE and PF fractions were 61.8 and 23.4%, respectively on a dry weight basis. Based on the fresh leaf pulp AE yield was 0.33%. The *Aloe* pulp from *A. barbadensis* farmed in Texas (USA) (Waller, Pelley, & Strickland, 2004) presented a lower yield (0.11%) compared to that of AE fraction.

The sugar composition of AE showed glucose (60.7 mol%) and mannose (28.7 mol%) as major neutral monosaccharides while for PF the content of glucose decreased (60.7–3.9 mol%) and that of mannose increased (from 28.7 to 94.2 mol%). Thus the PF mannose:glucose molar ratio corresponds to 24:1. Different Man:Glc ratios have been reported for glucomannans isolated from *A. barbadensis*, such as 22:1 (Mandal & Das, 1980b), 19:1–4.5:1 (Gowda et al., 1979), and 15:1 (Chow et al., 2005).

The percentage of total uronic acid content was 4.5 and 1.5% for AE and PF, respectively. The presence of uronic acids together with traces percentages of arabinose and rhamnose are indicative of residual amounts of pectic polysaccharides in the PF fraction as was previously observed in the water-soluble extracts of *A. vera* leaf pulp (Femenia, Sánchez, Simal, & Rosselló, 1999; Ni et al., 2004).

The acetyl content of AE (9.2%) and PF (18.4%) corresponds to a degree of substitution (DS) of 0.38 and 0.84, respectively. The latter value is similar to those reported for the glucomannan isolated from *A. vera* (0.78) (Gowda et al., 1979) and the mannans from *A. saponaria* (0.87) and *A. vanbalenu* (0.81) (Gowda, 1980). Differently, the acetylated glucomannans isolated from *A. plicatilis* (Paulsen et al., 1978) and *A. arborescens* (Wozniowski et al., 1990) presented a relatively lower (0.67) and higher (1.3) DS, respectively.

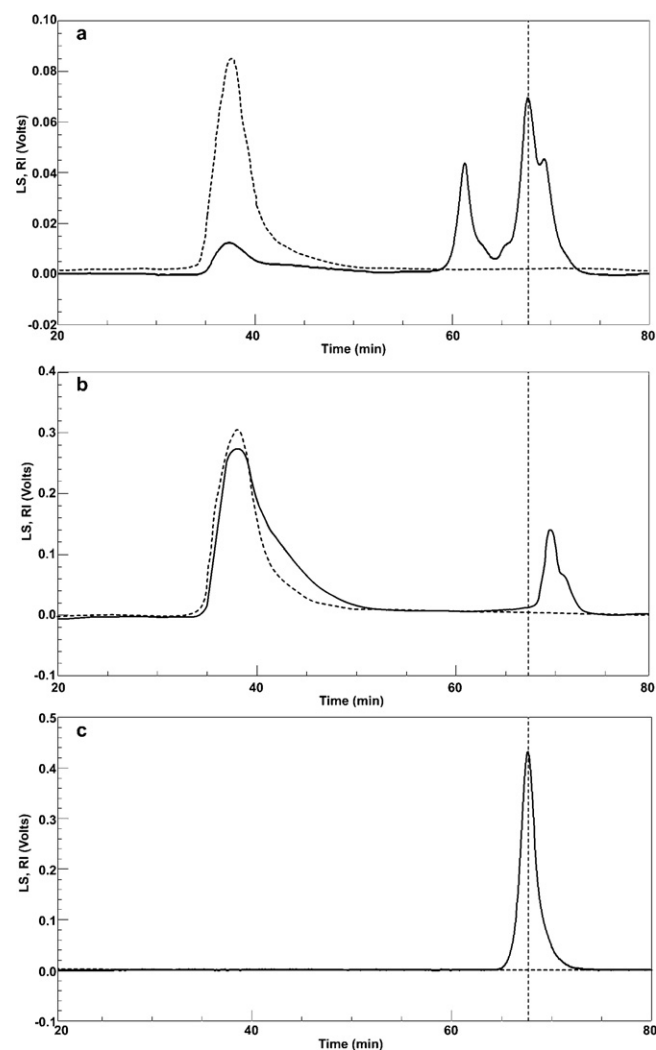


Fig. 1. Elution profile of AE (a) and PF (b) fractions from *Aloe barbadensis* and glucose standard (c) obtained by HPSEC–MALLS–RI. MALLS (---) and RI (—).

The differences in the chemical composition of glucomannans (Man:Glc ratio and acetyl content) isolated from *Aloe* species were attributed to several factors such as seasonal variations (Femenia et al., 1999; Wang & Strong, 1993), geographic locations (Mandal & Das, 1980a) and/or pulp processing (Femenia et al., 2003; Rodríguez-González et al., 2011) and extraction and purification methods (Alonso-Sande, Teijeiro-Orsorio, Remuñán-López, & Alonso, 2009; Gowda et al., 1979).

Methylation analysis of PF showed the presence of 2,3,6-tri-*O*-methylmannose (96%) and 2,3,6-tri-*O*-methylglucose (4.0%) in agreement with the presence of a linear polymer constituted by 4-linked mannopyranose and glucopyranose residues.

3.2. HPSEC/MALLS/RI analyses

Fig. 1 illustrates the elution profiles of AE and PF fractions obtained by HPSEC/MALLS/RI as a function of elution time.

AE fraction from *A. barbadensis* Miller exhibited a multimodal elution profile by HPSEC–MALLS–RI. As observed in Fig. 1a this fraction exhibit heterogeneous and polydisperse profile. AE presents, as shown by the RI detector, three distinct peaks of major intensity at 38, 62 and 68 min. The RI detector main peak eluted at 68 min was assigned to glucose in agreement with the HPSEC profile of this sugar (Fig. 1c) and with the monosaccharide composition and NMR data (see later) of this fraction.

PF sample presents only the peak at 38 min (Fig. 1b) coincidental with that observed in AE (the peak at 70 min = total volume of our chromatographic system corresponds to salts). With MALLS, a large peak was detected at ~38 min for AE and PF, corresponding to a compound with high molecular weight, assigned to the partially acetylated glucomannan. The MW of this polysaccharide was determined as 1.2 MDa.

3.3. NMR analyses of AE and PF fractions

The ^{13}C NMR spectrum of AE (Fig. 2a) showed two major signals in the anomeric region at 92.2 and 96.0 ppm, corresponding to C-1 of α - and β -anomers of glucose reducing units, respectively (Gorin & Mazurek, 1975). These results show the presence of free glucose units in the extract in accordance with the high reducing sugars content (data not shown) determined by the colorimetric method of Miller (1959). Differently, in the ^{13}C NMR spectrum of PF (Fig. 2b) the aforementioned signals were not observed in agreement with HPSEC/MALLS/RI results (Fig. 1). The ^1H and ^{13}C NMR spectra of PF were partially assigned using 1D (^{13}C DEPT) and 2D ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ COSY and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC) experiments and literature data (Hannuksela & Penhoat, 2004; van Hazendonk, Reinerink, de Waard, & van Dam, 1996).

The PF ^{13}C NMR spectrum shows an anomeric major signal at 100.2 ppm, attributed to C-1 of β -mannopyranosyl units. In the ^1H NMR spectrum of PF (S1) the presence of anomeric signals at 4.75 and 4.71 ppm are in agreement with β -glycosidic linkage. From the HSQC experiment (Fig. 3), the correlations at 100.2/4.75, 4.71, 70.1/4.10, 71.5/3.79, 76.8/3.82, and 60.6/3.75, 3.88 ppm were assigned to C-1/H-1–C-4/H-4 and C-6/H-6a,b, respectively of the 4-linked β -D-mannopyranosyl units. The C-5 signal at 75.1 ppm shows correlations with H-5 protons at 3.61, 3.54, and 3.46 ppm corresponding to 4-linked β -D-mannopyranosyl units on different chemical environments and/or to acetylated (2- and 2,3-) 4-linked β -D-mannopyranosyl units. These assignments are in good agreement with the values reported for 4-linked β -D-mannopyranosyl units constituent of the glucomannan isolated from fiber flax (van Hazendonk et al., 1996) and the galactoglucomannan from spruce pulp (Hannuksela & Penhoat, 2004). The COSY spectrum of PF showed two sets of H-1/H-2 (4.75/4.10 and 4.71/4.10 ppm), H-2/H-3 (4.10/3.79 ppm), H-5/H-6b (3.61/3.88 ppm) and H-6a/H-6b (3.75/3.88 ppm) correlations. Some of these correlations are shown in Fig. 4.

In the ^{13}C NMR spectrum of PF the signal of very low intensity at 102.5 ppm (correlated with the H-1 at 4.52 ppm in the HSQC experiment, Fig. 3) indicates the presence of 4-linked β -glucopyranosyl units. HSQC correlations at 73.1/3.36 and 77.1/3.66 ppm were attributed to C-2/H-2 and C-4/H-4, respectively of the aforementioned units (Capek, Alföldi, & Lišková, 2002; Hannuksela & Penhoat, 2004; Sims, Craik, & Bacic, 1997) in agreement with the presence of 4-linked glucopyranose residues as determined by methylation analysis.

Moreover, the ^{13}C NMR spectrum of PF (Fig. 2b) presented signals of methyl carbons at 20.2 (major), 20.0 (medium) and 20.5 ppm (minor) and carboxyl carbons (173.8 and 173.0 ppm) of acetyl groups indicating that PF contains an acetylated mannan. The ^1H NMR spectrum (S1) of this fraction presents four signals corresponding to methyl groups at 2.15 (major), 2.10 (medium), 2.19 and 2.18 (minors) ppm indicating that the acetyl groups are located on different positions. The HSQC spectrum (Fig. 3) showed that these methyl protons are correlated with the aforementioned methyl carbons of acetyl groups (20.2/2.15, 2.10, 20.0/2.18, 2.19 and 20.5/2.18, 2.19 ppm).

The HSQC spectrum of PF also showed correlations at 98.9/4.87 (C-1/H-1), 71.5/5.45 and 71.7/5.38 (C-2/H-2), 70.1/4.03 and 70.1/3.97 (C-3/H-3) attributed to 2-acetylated 4-linked

β -mannopyranosyl units (Hannuksela & Penhoat, 2004; Teleman, Nordström, Tenkanen, Jacobs, & Dahlman, 2003; van Hazendonk et al., 1996). The presence of O-2 acetylated mannose residues on different chemical environments was confirmed by 2D COSY correlations H-1/H-2 (4.87/5.38 ppm) and two sets of H-2/H-3 (5.38/3.97 and 5.45/4.03 ppm). These assignments are in agreement with those reported for partially acetylated polysaccharides such as a glucomannan isolated from *Linum usitatissimum* L. (van Hazendonk et al., 1996) and a galactoglucomannan from spruce wood (Hannuksela & Penhoat, 2004).

In the PF ^{13}C NMR spectrum the low intensity signal at 99.7 ppm was attributed to C-1 of 3-acetylated 4-linked β -mannopyranosyl units (Hannuksela & Penhoat, 2004; van Hazendonk et al., 1996). Furthermore the HSQC correlations at 68.7/4.18 and 73.6/5.03 ppm were assigned to C-2/H-2 and C-3/H-3, respectively of 3-acetylated mannopyranosyl units and agree with the downfield shift of H-2, H-3 and C-3 as well as to the upfield shift of C-2 when compared with the respective resonances of 4-linked β -mannopyranosyl units (van Hazendonk et al., 1996). For the aforementioned acetylated mannose residues the COSY spectrum (Fig. 4) showed two sets of H-3/H-4 correlations (5.03/4.04 and 5.03/4.08 ppm) probably indicating the different neighboring monosaccharide residues.

In the HSQC spectrum the anomeric correlations at 98.3/4.98 and 98.3/4.97 ppm together with others at 69.7/5.47, 69.7/5.40 (C-2/H-2), 71.9/5.17 (C-3/H-3) and 73.1/4.08 (C-4/H-4) showed that PF contains 2,3-diacetylated mannose residues. The COSY spectrum (Fig. 4) showed H-1/H-2, H-2/H-3 and H-3/H-4 correlations at 4.98/5.47, 5.47/5.17 and 5.17/4.08, respectively. Additional H-1/H-2 and H-2/H-3 correlations at 4.97/5.40 and 5.40/5.17 ppm, respectively were also seen in the COSY spectrum. These data are in accordance with the downfield shift of the geminal H-2 (1.37 to 1.30 ppm) and H-3 protons (1.38 ppm) and the vicinal protons (0.22–0.27 ppm for H-1 and 0.26 ppm for H-4), due to the presence of acetyl groups on both, O-2 and O-3 of 4-linked β -D-mannopyranosyl units.

The ^{13}C DEPT spectrum (S2) of PF presents an inverted signal at 63.1 ppm ascribed to C-6 of 6-O-acetyl mannopyranosyl units. This resonance was shifted downfield (2.5 ppm) in comparison with that of unsubstituted C-6 (60.6 ppm, also DEPT inverted). In the HSQC spectrum the correlations at 63.1/4.28, 4.48 ppm corresponding to C-6/H6a,b confirm that PF also contains mannopyranosyl units C-6 substituted by acetyl groups. The C-6, H-6a and H-6b downfield shifts of the 6-acetylated mannopyranosyl units (2.5, 0.53 and 0.60 ppm, respectively) are in good accordance with those reported for 6-acetylated galactose residues in the disaccharide β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Rha obtained from the exopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex bacteria (2.6 for C-6 and 0.53 ppm for H-6) (Cescutti, Impallomeni, Garozzo, & Rizzo, 2011). For the glycolipids in equine erythrocyte membrane the H-6a and H-6b from O-6 acetylated galactose showed downfield shifts of 0.77 and 0.84 ppm, respectively (Yachida, Tsuchihashi, & Gasa, 1997). The carbon resonances of unsubstituted and acetylated C-6 had relative integrals of 1:0.58 showing that PF presents 37% of the total mannopyranosyl units bearing acetyl groups on O-6. Additionally in the HSQC spectrum of PF the correlation at 72.6/3.66 ppm was attributed to C-5/H-5 of 6-O-acetylated mannopyranosyl units. The C-5 upfield shift (2.5 ppm) and H-5 downfield shift (0.05–0.20 ppm) are in agreement with the effect of C-6 acetyl groups on the vicinal carbon and proton (Cescutti et al., 2011). The amount of 38% obtained from the relative integrals of C-5 carbon areas is in agreement with that determined from C-6 carbon areas (37%).

The acetyl groups' location on partially acetylated glucomanans isolated from *A. barbadensis* and *A. plicatilis* have been established based on methylation analysis (Manna & McAnalley, 1993; Paulsen et al., 1978) or as for *A. arborescens* with the additional use of ^1H NMR spectroscopic analysis (Wozniowski et al.,

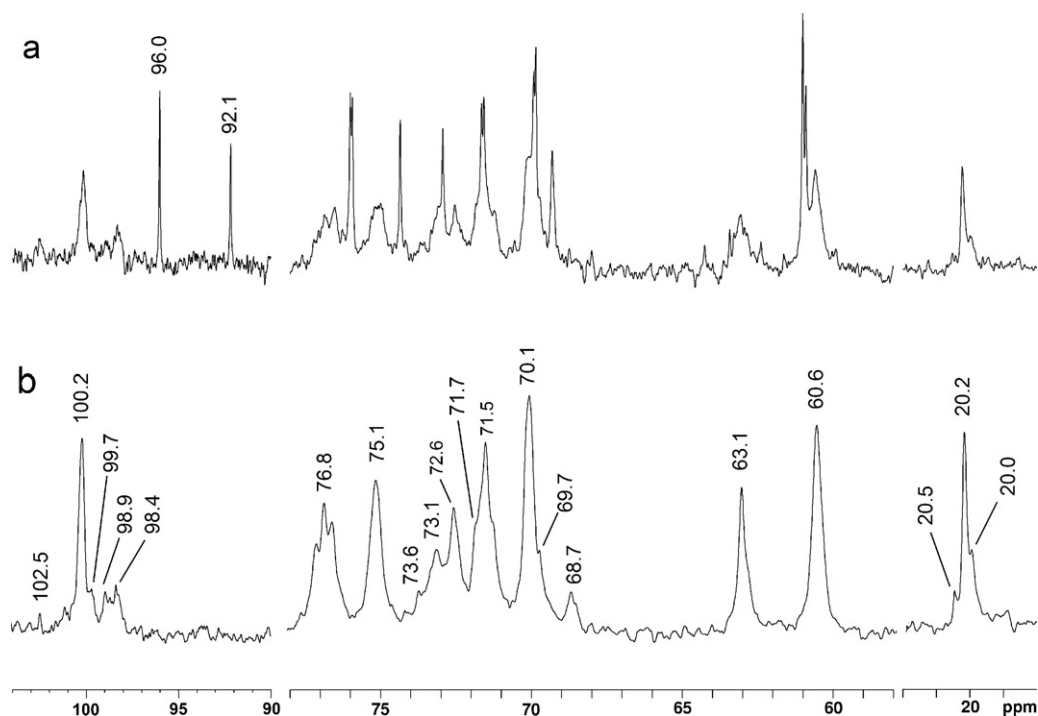


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of AE (a) and PF (b) fractions from *Aloe barbadensis*.

1990). The acetylated polysaccharide from *A. barbadensis* presents acetyl groups on O-2,3 and O-6 of mannose residues in a ~1:1 ratio (Manna & McAnalley, 1993). Methylation analysis and ^1H NMR data showed that the glucomannan obtained from *A. arborescens* presents similar proportions of acetylated mannose residues at positions O-2,3,6, O-2,3 and O-6 besides minor amounts of acetyl substitution at O-3,6 (Wozniowski et al., 1990). Differently the

glucomannan isolated from *A. plicatilis* contains mannose and glucose residues substituted by acetyl groups at positions O-2,3,6, O-2,3 and O-3 (Manna & McAnalley, 1993; Paulsen et al., 1978).

Otherwise in the present work the pattern of acetylation of the glucomannan from *A. barbadensis* Miller was for the first time established using bidimensional NMR analyses. Therefore the NMR techniques together with chemical analyses demonstrate that PF

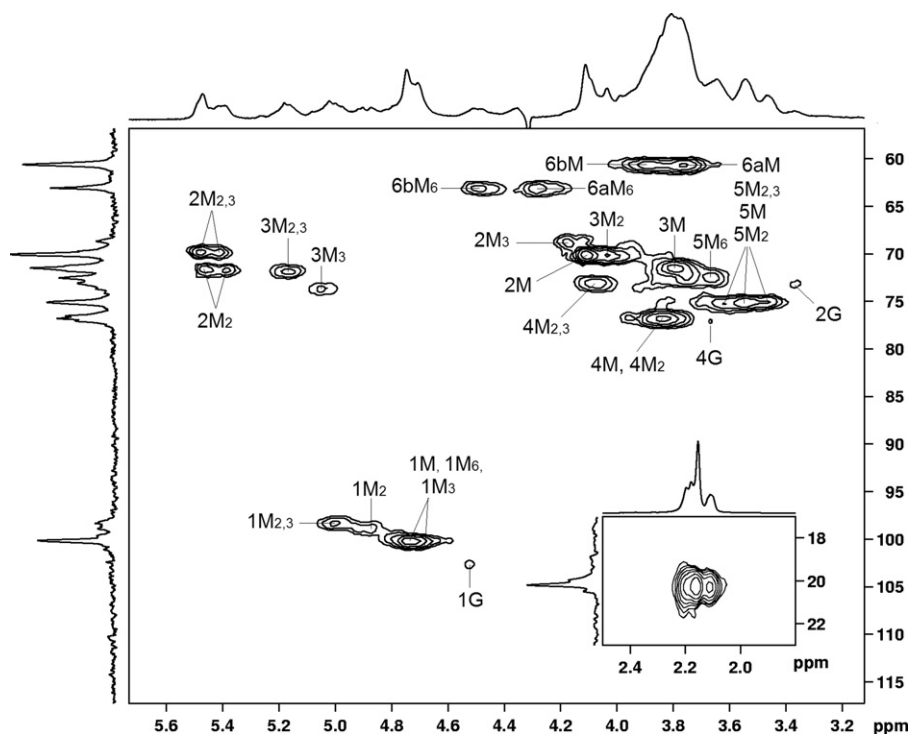


Fig. 3. HSQC spectrum of PF. M and G mean 4-linked mannopyranosyl and glucopyranosyl units, respectively. The first number corresponds to the correlated atom position. The acetyl positions are shown in subscript. For example $1\text{M}_{2,3}$ corresponds to C-1/H-1 correlation of 4-linked mannopyranosyl units bearing acetyl groups on O-2 and O-3. Insert: methyl correlations of acetyl groups.

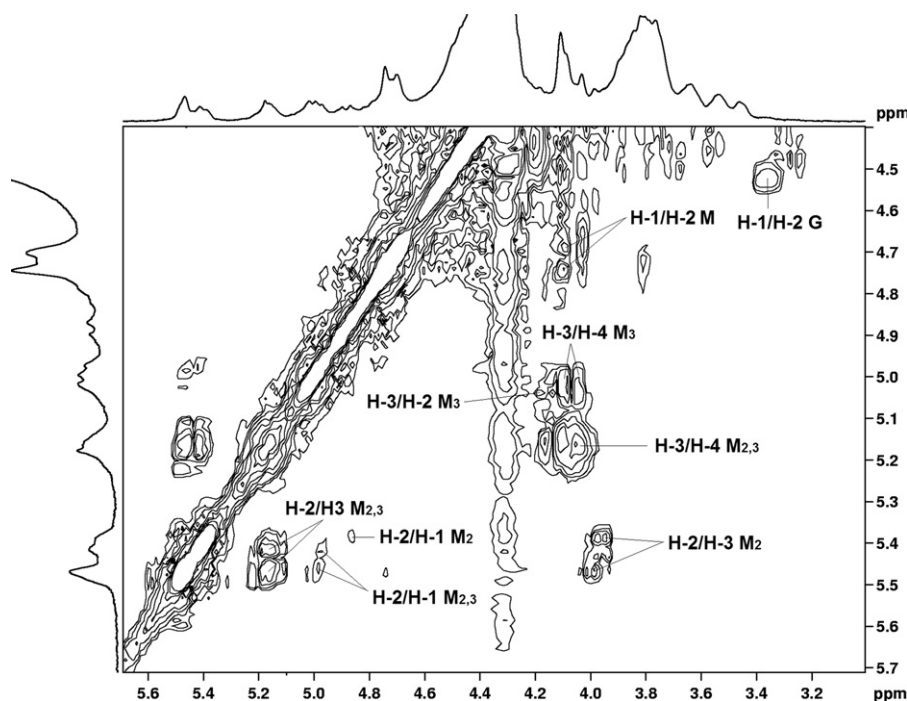


Fig. 4. COSY spectrum of PF. M and G mean 4-linked mannopyranosyl and glucopyranosyl units, respectively. The acetyl positions are shown in subscript.

consists of a partially acetylated 4-linked β -D-glucomannan with the acetyl groups located at O-2,3, O-2, O-3, and O-6 of mannopyranosyl units.

3.4. Flow behavior of aqueous solution of AE and PF

Together with the chemical structure study of *A. barbadensis* acetylated glucomannan, an additional investigation was performed with AE and PF in order to understand how composition and structure affect their physicochemical and rheological behavior.

The rheological properties of glucomannans from plant origin are still under study (Alonso-Sande et al., 2009; Alvarez-Manceño, Mariana, & Martínez-Pacheco, 2008; Du, Li, Chen, & Li, 2012; Nishinari & Zhang, 2004; Williams et al., 2010; Yin, Zhang, Huang, & Nishinari, 2008). There are some parameters which affect the rheological behavior of glucomannans, such as acetylation degree, molecular weight, temperature, and polymer concentration. Gelation is favored when molecular weight, concentration or temperature increase and acetylation decreases (Alonso-Sande et al., 2009; Du et al., 2012; Huang, Takahashi, Kobayashi, Kawase, & Nishinari, 2002).

Aqueous solutions of AE and PF (0.1, 0.2 and 0.3 g L⁻¹) were compared through their flow curves (Fig. 5). For both fractions, a non-Newtonian shear-thinning behavior was found, as previously reported for *A. barbadensis* leaf pulp polysaccharides from plants cultivated in Chile (Opazo-Navarrete et al., 2012), CA, USA (Ni et al., 2004) and Israel (Yaron, 1993). PF showed higher viscosity than AE at all the tested shear rates. At 0.01 s⁻¹ and concentration of 0.3 g L⁻¹, PF had an apparent viscosity of 300.0 mPa s, while AE showed a value of 44.8 mPa s (Fig. 5). For PF, mainly constituted by high molecular weight polysaccharides (as demonstrated in Fig. 1) and consequently subject to greater deformations, its solutions have higher levels of pseudoplasticity than those of AE.

Besides the influence of molecular mass on viscosity, some authors (Du et al., 2012; Oosterveld, Beldman, Searle-van Leeuwen, & Voragen, 2000; Pippen, McCready, & Owens, 1950; Sengkhamparn et al., 2010; Vriesmann, Amboni, & Petkowicz, 2011) suggested that the acetylation degree of polysaccharides

also plays an important role in this rheological parameter by promoting hydrogen bonding and hydrophobic interaction. Du et al. (2012) proposed, by the rheological analysis of konjac acetylated glucomannan, that hydrophobic interaction was weakened while hydrogen bonding strengthened with increasing degree of acetylation. The higher viscosity obtained for PF that presents higher acetyl content (18.4%) when compared to that of AE (9.2%), could suggest the priority of hydrogen bonding and a delay in the gelation process (Huang et al., 2002).

Among the models used to describe the rheological behavior of natural and synthetic polymers, we tested those of Ostwald de Waele (Power Law), Herschel–Bulkley and Carreau–Yasuda for AE and PF samples. The best statistical parameters for adjusting the experimental data were calculated by the Ostwald de Waele model, $\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$, where η is the apparent viscosity (Pa s), $\dot{\gamma}$ is the shear rate

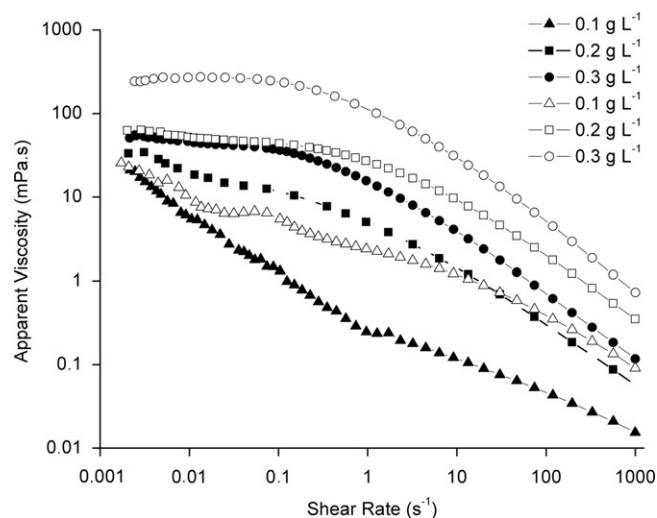


Fig. 5. Apparent viscosity as function of shear rate for *Aloe* extract, AE ($\blacktriangle$, $\blacksquare$, $\bullet$) and polysaccharidic fraction, PF ($\triangle$, $\square$, $\circ$) in aqueous solutions at concentrations of 0.1, 0.2 and 0.3 g L⁻¹, at 25 °C.

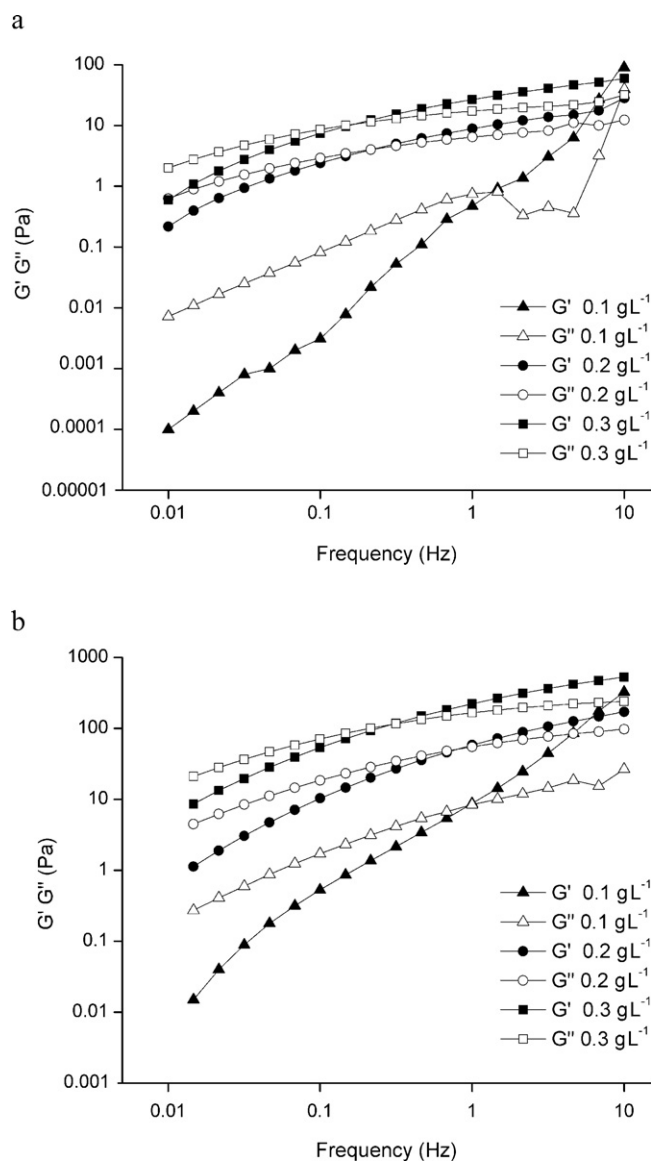


Fig. 6. Frequency sweeps of AE (a) and PF (b) in aqueous solutions, at concentrations of 0.1, 0.2 and 0.3 g L⁻¹, at 25 °C. G' , elastic modulus; G'' , viscous modulus.

(s⁻¹), K is the consistency coefficient (Pa s ^{n}) and n the flow behavior index (dimensionless). The values of K and n at 0.3 g L⁻¹ were 4.15 Pa s ^{n} and 0.68 for AE and 14.17 Pa s ^{n} and 0.56 for PF, respectively. Both samples presented flow behavior index (n) values lower than one ($n < 1$) and the consistency coefficient (K) was greater than one ($K > 1$) for all the concentrations tested, confirming their shear-thinning behavior. However, it was noted that PF had a lower n value, suggesting a more pseudoplastic behavior.

3.5. Viscoelastic behavior of aqueous solution of AE and PF

Polysaccharide solutions are viscoelastic materials that exhibit solid and liquid characteristics simultaneously (Bourbon et al., 2010), where G' and G'' moduli refer to elastic and viscous response of a given material, respectively. It is possible to quantify the predominance of the solid or liquid character of a sample through dynamic measurements.

Frequency sweeps of AE and PF fractions (Fig. 6), showed frequency dependence of G' and G'' . It was found that both samples showed a typical concentrated solution behavior, with G'' higher than G' at low frequencies. At 0.3 g L⁻¹ concentration they

Table 2

The crossover frequency of G' and G'' of *Aloe* extract (AE) and polysaccharidic fraction (PF) obtained from *Aloe barbadensis* Miller at different concentrations.

Sample	Concentration (g L ⁻¹)	$G' = G''$ (Pa) ^a	Frequency (Hz)
AE	0.1	0.8	1.4
	0.2	4.0	0.2
	0.3	10.6	0.2
PF	0.1	8.2	1.0
	0.2	51.1	0.8
	0.3	114.4	0.3

^a Values obtained in frequency from 0.01 to 10 Hz.

presented similar G' and G'' crossover frequencies, 0.2 Hz for AE and 0.3 Hz for PF (Table 2). For both samples, the increase of concentration in the aqueous system caused an increase in the values of crossover frequency.

The crossover frequency provides a good indication of the viscoelastic behavior of a given material. The lower the crossover value is, greater is the elastic contribution (Ramachandran, Chen, & Etzler, 1999). G' values at the crossover frequency for AE and PF, show a more elastic behavior at higher concentrations (0.3 g L⁻¹, Table 2). For PF fraction, G' values were about 10 times higher at the same concentration than those determined for AE, indicating a higher viscoelastic characteristic of the former. Comparing the G' values at the crossover frequency of PF aqueous solution at 0.3 g L⁻¹ (114.4 Pa at 0.3 Hz) and konjac partially acetylated glucomannan at 1 wt% (~3 Pa at 3 Hz) (Du et al., 2012), it can be inferred that PF even at a much lower concentration presented higher viscoelastic properties than konjac glucomannan.

PF contains a major high molecular weight polysaccharide, a partially acetylated glucomannan, stabilized by a mixture of hydrophobic interactions and hydrogen bonding between the polysaccharide chains. This feature is in agreement with the fact that the dispersions showed a typical concentrated solution behavior. The aforementioned interactions are related with the molecular structure and the presence of high acetyl content that determines the non-Newtonian flow behavior, as well as the creep analysis results (S3), where the characteristic of viscoelastic fluid is marked.

The study of Ni et al. (2004) found in the polysaccharidic fraction obtained from the leaf pulp of *A. barbadensis*, a glucomannan with percentages of 63 and 13% of mannose and glucose, respectively. The authors suggest that the glucomannan is the responsible for the viscoelastic property, in agreement with the rheological behavior observed for PF, a mannose-rich partially acetylated glucomannan.

4. Conclusions

The structural and rheological properties of the *Aloe* extract (AE) and the polysaccharidic fraction (PF) obtained from the leaf pulp of *A. barbadensis* Miller were investigated. Chemical, spectroscopic and HPSEC–MALLS–RI analyses carried out on the polysaccharidic fraction demonstrate that *A. barbadensis* produces a partially acetylated 4-linked β-D-glucomannan of high molecular weight. The acetyl groups are positioned at O-2 and O-3, O-2, O-3, and/or O-6 of mannopyranosyl units. The acetylation pattern of this type of polysaccharide was for the first time established using bidimensional NMR analyses. On the other hand the AE extract is composed by a high amount of free glucose (~61%) besides minor amounts of the aforementioned acetylated polysaccharide.

This study confirmed that the rheological response of AE and PF aqueous fractions, at 25 °C showed a pseudoplastic behavior in all tested concentrations, and the dynamic oscillatory assay demonstrated that both samples behaved as a typical concentrated solution. For PF, G' values were about 10 times higher for the same concentration than those of AE, indicating higher viscoelastic

characteristic of the former. The elastic contribution after crossover obtained for PF at higher values of G' compared to AE can be given by the higher content of the partially acetylated glucomannan present in PF.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian agencies, CNPq, Fundação Araucária (PRONEX-Carboídratos), Rede Nanoglicobiotech-MCT/CNPq for financial support and Prof. Maria Rita Sierakowski for the use of the rheometer. J.L.S., M.E.D. and M.D.N. are Research Members of the National Research Council of Brazil (CNPq). L.H.C. acknowledges a doctoral scholarship from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.020>.

References

- Alonso-Sande, M., Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-Lopez, C., & Alonso, M. J. (2009). Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 543–562.
- Alvarez-Manceño, F., Mariana, L., & Martínez-Pacheco, R. (2008). Konjac glucomannan/xanthan gum enzyme sensitive binary mixtures for colonic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 573–581.
- Ascêncio, S. D., Orsato, A., França, R. A., Duarte, M. E. R., & Nosedá, M. D. (2006). Complete ^1H and ^{13}C assignment of digeneaside, a low-molecular-mass carbohydrate produced by red seaweeds. *Carbohydrate Research*, 341, 677–682.
- Boudreau, M. D., Olson, G. R., Pogribna, M., Pogribny, I., & Beland, F. A. (2005). Consumption of *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) induces hyperplasia in the colon of F-344 rats and B6C3F1 mice. *The FASEB Journal*, 19, A450–A451.
- Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Ribeiro, C., Miranda, C., Maia, J. M., Teixeira, J. A., et al. (2010). Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: Comparison with guar gum and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*, 24, 184–192.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Burdock, G. A. (1997). *Aloe extract (Aloe spp.)*. *Encyclopedia of food and color additives*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 105–106.
- Capek, P., Alföldi, J., & Lišková, D. (2002). An acetylated galactoglucomannan from *Picea abies* L. Karst. *Carbohydrate Research*, 337, 1033–1037.
- Cescutti, P., Impallomeni, G., Garozzo, D., & Rizzo, R. (2011). O-acetyl localization on Cepacian, the principal exopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Carbohydrate Research*, 346, 2905–2912.
- Chow, J. T. N., Williamson, D. A., Yates, K. M., & Goux, W. J. (2005). Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate Research*, 340, 1131–1142.
- Chun-hui, L., Chang-hai, W., Zhi-liang, X., & Yi, W. (2007). Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water. *Process Biochemistry*, 42, 961–970.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209–217.
- Du, X., Li, J., Chen, J., & Li, B. (2012). Effect of degree of deacetylation on physicochemical and gelation properties of konjac glucomannan. *Food Research International*, 46, 270–278.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Femenia, A., García-Pascual, P., Simal, S., & Rosselló, C. (2003). Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, 51, 397–405.
- Femenia, A., Sánchez, E. S., Simal, S., & Rosselló, C. (1999). Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, 39, 109–117.
- Freitas, R. A., Busato, A. P., Mitchell, D. A., & Silveira, J. L. M. (2011). Degalactosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC–MALLS and viscosimetry. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1636–1642.
- Filiseti-Cozzi, T. M. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157–162.
- Gorin, P. A. J., & Mazurek, M. (1975). Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Canadian Journal of Chemistry*, 53, 1212–1222.
- Gowda, D. C. (1980). Structural studies of polysaccharides from *Aloe saponaria* and *Aloe vanbalenii*. *Carbohydrate Research*, 83, 402–405.
- Gowda, D. C., Neelisiddaiah, B., & Anjaneyalu, Y. V. (1979). Structural studies of polysaccharides from *Aloe vera*. *Carbohydrate Research*, 72, 201–205.
- Hannuksela, T., & Penhoat, C. H. (2004). NMR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. *Carbohydrate Research*, 339, 301–312.
- Hestrin, S. (1949). The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *Journal of Biological Chemistry*, 180, 249–261.
- Huang, L., Takahashi, R., Kobayashi, S., Kawase, T., & Nishinari, K. (2002). Gelation behavior of native and acetylated konjac glucomannan. *Biomacromolecules*, 3, 1296–1303.
- Jansson, P. E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., & Lönngrén, L. (1976). A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chemical Communication*, 8, 1–74.
- Mabusela, W. T., Stephen, A. M., & Botha, M. C. (1990). Carbohydrates polymers from *Aloe ferox* leaves. *Phytochemistry*, 29, 3355–3358.
- Manna, S., & McAnalley, B. (1993). Determination of the position of the O-acetyl group in a β -(1 $\rightarrow$ 4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Research*, 241, 317–319.
- Mandal, G., & Das, A. (1980a). Structure of the D-galactan isolated from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Research*, 86, 247–257.
- Mandal, G., & Das, A. (1980b). Structure of the glucomannan isolated from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Research*, 87, 249–256.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.
- Ni, Y., Turner, D., Yates, K. M., & Tizard, I. (2004). Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *International Immunopharmacology*, 4, 1745–1755.
- Nishinari, K., & Zhang, H. (2004). Recent advance in the understanding of heat set gelling polysaccharides. *Trends in Food Science Technology*, 15, 305–312.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Searle-van Leeuwen, M. J. F., & Voragen, A. G. J. (2000). Effect of enzymatic deacetylation on gelation of sugar beet pectin in the presence of calcium. *Carbohydrate Polymers*, 43, 249–256.
- Opazo-Navarrete, M., Tabilo-Munizaga, G., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., & Pérez-Won, M. (2012). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the rheological properties of *Aloe vera* suspensions (*Aloe barbadensis* Miller). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.006>
- Paulsen, B. S., Fagerheim, E., & Øverbye, E. (1978). Structural studies of the polysaccharide from *Aloe plicatilis* Miller. *Carbohydrate Research*, 60, 345–351.
- Pippen, E. L., McCready, R. M., & Owens, H. S. (1950). Gelation properties of partially acetylated pectins. *Journal of American Chemistry Society*, 72, 813–816.
- Ramachandran, S., Chen, S., & Etzler, F. (1999). Rheological characterization of hydroxypropylcellulose gels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 153–161.
- Reynolds, T., & Dweck, A. C. (1999). *Aloe vera* leaf gel: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 3–37.
- Rodríguez-González, V. M., Femenia, A., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Candelas-Cadillo, M. G., et al. (2011). Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1675–1683.
- Sengkhampan, N., Sagis, L. M. C., de Vries, R., Schols, H. A., Sajjaanantakul, T., & Voragen, A. G. J. (2010). Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Food Hydrocolloids*, 24, 35–41.
- Simões, J., Nunes, F., Domingues, M., Coimbra, P., & Domingues, M. A. M. R. (2012). Mass spectrometry characterization of an *Aloe vera* mannan presenting immunostimulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 90, 229–236.
- Sims, I. M., Craik, D. J., & Bacic, A. (1997). Structural characterization of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. *Carbohydrate Research*, 303, 79–92.
- Somboonwong, J., Jariyapongskul, A., Thanamitramanee, S., & Patumraj, S. (2000). Therapeutic effects of *Aloe vera* on cutaneous micro-circulation and wound healing in second degree burn model in rats. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 83, 417–425.
- Techawipharat, J., Suphantharika, M., & BeMiller, J. N. (2008). Effects of cellulose derivatives and carrageenans on the pasting, paste, and gel properties of rice starches. *Carbohydrate Polymers*, 73, 417–426.
- Teleman, A., Nordström, M., Tenkanen, M., Jacobs, A., & Dahlman, O. (2003). Isolation and characterization of O-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. *Carbohydrate Research*, 338, 525–534.
- van Hazendonk, J. M., Reinerink, E. J. M., de Waard, P., & van Dam, J. E. G. (1996). Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.). *Carbohydrate Research*, 291, 141–154.
- Visuthikosol, V., Sukwanarat, Y., Chowchuen, B., Sriuraitana, S., & Boonpuaknavig, V. (1995). Effect of *Aloe vera* gel to healing of burn wound a clinical and histological study. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 78, 403–409.
- Vriesmann, L. C., Amboni, R. D. M. C., & Petkowicz, C. L. O. (2011). Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 34, 1173–1181.
- Wang, Y. T., & Strong, K. J. (1993). Monitoring physical and chemical properties of freshly harvested field-grown *Aloe vera* leaves. A preliminary report. *Phytotherapy Research*, 7, S1–S4.
- Waller, T. A., Pelley, R. P., & Strickland, F. M. (2004). Industrial processing and quality control of *Aloe barbadensis* (*Aloe vera*) gel. In *Aloes—The genus Aloe*. Boca Raton: CRC press.

- Williams, L. D., Burdock, G. A., Shin, E., Kim, S., Jo, T. H., Jones, K. N., et al. (2010). Safety studies conducted on a proprietary high-purity *Aloe vera* inner leaf fillet preparation, Qmatrix®. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 57, 90–98.
- Wolfom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride. In R. L. Whistler, & M. L. Wolfom (Eds.), *Methods in carbohydrate chemistry* (pp. 65–68). New York: Academic Press.
- Wolfom, M. L., & Thompson, A. (1963b). Acetylation. In R. L. Whistler, & M. L. Wolfom (Eds.), *Methods in carbohydrate chemistry* (pp. 211–215). New York: Academic Press.
- Wozniowski, T., Blaschek, W., & Franz, G. (1990). Isolation and structural analysis of a glucomannan from the leaves of *Aloe arborescens* var. Miller. *Carbohydrate Research*, 198, 387–391.
- Xu, C., Leppänen, A. S., Eklund, P., Holmlund, P., Sjöholm, R., Sundberg, K., et al. (2010). Acetylation and characterization of spruce (*Picea abies*) galactomannans. *Carbohydrate Research*, 345, 810–816.
- Yachida, Y., Tsuchihashi, K., & Gasa, S. (1997). Novel di-O-acetylated GM3s from equine erythrocytes, one containing 4,9-di-O-acetyl-N-glycolylneuraminic acid and another containing 4-O-acetyl-N-glycolylneuraminic acid and 6-O-acetyl-D-galactose. *Carbohydrate Research*, 298, 201–212.
- Yaron, A. (1993). Characterization of *Aloe vera* gel before and after autodegradation, and stabilization of the natural fresh gel. *Phytotherapy Research*, 7, S11–S13.
- Yin, W. C., Zhang, H. B., Huang, L., & Nishinari, K. (2008). Effects of the lyotropic series salts on the gelation of konjac glucomannan in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 74, 68–78.