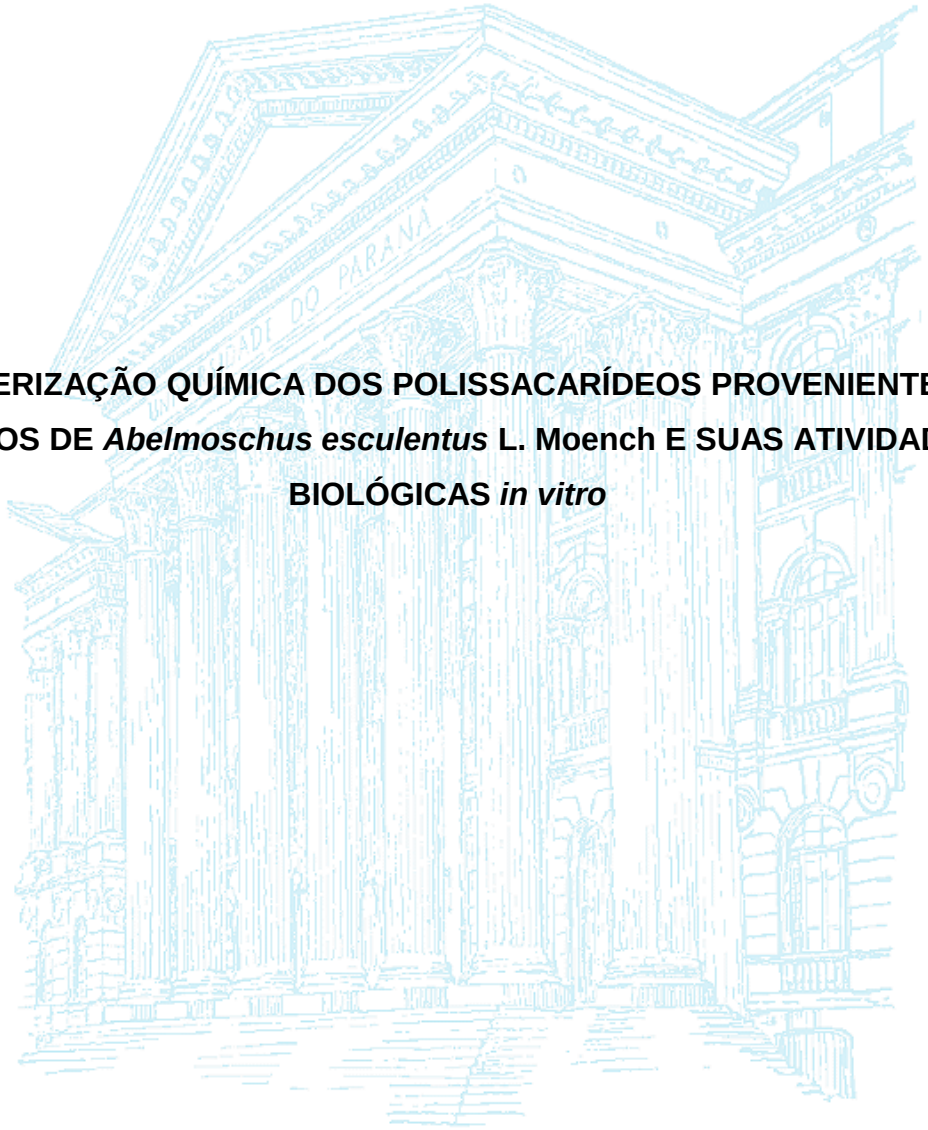
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELINA SEYFRIED



# CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DOS FRUTOS DE *Abelmoschus esculentus* L. Moench E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro*

CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELINA SEYFRIED

# CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS PROVENIENTES DOS FRUTOS DE *Abelmoschus esculentus* L. Moench E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profª Drª Juliana Bello Baron Maurer
Co-Orientadora: Profª Drª Fabíola Regina Stevan

CURITIBA
2014

**TERMO DE APROVAÇÃO**

MELINA SEYFRIED

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS PROVENIENTE DOS FRUTOS DE *Abelmoschus esculentus* L. Moench E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro***

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

Profª Dr ª Juliana Bello Baron Maurer
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná
(Orientadora)

Profª Drª Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná

Dr. Luciano Henrique Campestrini
Laboratório de Anatomia Patológica
Departamento de Patologia Médica
Hospital de Clínicas (HC-UFPR)

Curitiba, 28 de Março de 2014

*A minha família, meu porto seguro.*

*A Deus*

## AGRADECIMENTOS

A minha maior base e amor eterno, meus pais Osmar Seyfried e Maria D. P. L. Seyfried por toda confiança, paciência pelas minhas ausências e por todo o orgulho que vocês sempre sentem por mim. Ao meu irmão, minha cunhada e meu sobrinho, Arthur Seyfried, Flavia Flores Seyfried e Pedro Q. Seyfried, sem vocês minha vida não estaria completa. A minha amada avô e tia, Anamaria Seyfried e Ruth Seyfried, pelo amor, força e orações. A toda minha família, meu agradecimento e o meu amor incondicional.

A melhor orientadora que alguém poderia ter, a querida e maravilhosa Profª Drª Juliana B. B. Maurer, Departamento de Bioquímica - UFPR. Obrigada por toda a força, confiança, paciência e por tudo que você fez e faz por mim. Minha segunda mãe científica que quero comigo para o resto da vida. Queria ter a capacidade de expressar os meus sentimentos, porém, palavras não significariam nada perto de toda a admiração e carinho que sinto. Obrigada por novamente ser minha orientadora.

A minha co-orientadora Profª Drª Fabíola R. Stevan - PUCPR/UP, minha primeira mãe científica, que me trouxe para o mundo da bioquímica e que até hoje permanece nele comigo. Obrigada por tudo. A querida Profª Drª Selma F. Zawadzki Baggio, Departamento de Bioquímica - UFPR, minha terceira mãe científica, a qual tenho uma enorme admiração. Obrigada por todas as confidências, bolos, conversas, amizade, alegria e por toda ajuda depositada nesse trabalho. Para fechar, a esse trio de mulheres/mães maravilhosas, minha eterna gratidão por tudo.

A minha fiel companheira de laboratório, Andressa S. Silva, meu grande presente do mestrado. Quem diria que apesar dos anos de diferenças na biologia, acabaríamos nos encontrando no mestrado. Obrigada grande amiga, por toda ajuda, paciência, carinho e preocupação. Estas palavras também servem para a Leilane C. Silva, outro grande presente do mestrado. Quero vocês perto de mim para o resto da vida.

Ao Ms. Fábio T. Yamassaki, grande parceiro de laboratório, obrigada por todos os momentos divertidos, de “gambiarras” e de ajuda. Sem você, esse trabalho não estaria completo, conte comigo para tudo.

Ao Dr. Luciano H. Compestrini, nosso “tio” científico, a pessoa que me ensinou muito do que eu sei e que ainda vai ensinar muito. Obrigada por toda ajuda, conhecimento, paciência e momentos ótimos. Sem você, esse trabalho também não estaria completo. Nunca nos abandone!

Aos demais companheiros, amigos e parceiros de laboratório, Vanessa Staldoni, Constanza De Matteu Monteiro e a Drª Fernanda Bovo pelos ótimos momentos de alegria, que ainda vão perdurar por muito tempo. Porque quem é do NUPPLAMED é *together!*

Ao Prof. Dr. Guilherme L. Sassaki, ao Dr. Arquimedes Santana e ao doutorando Diego Sabry, Departamento de Bioquímica - UFPR, por todos os ótimos momentos e pelas análises de RMN.

A querida Profª Drª Carmen L. O. Petkowicz, Departamento de Bioquímica - UFPR, obrigada pela ajuda nas análises no DIONEX, bem como pelas correções e sugestões para o trabalho. Muito Obrigada.

A Profª Drª Thelma Alvim Veiga Ludwig, Departamento de Botânica - UFPR, pela gentileza de permitir o uso do microscópio para captura das imagens.

As técnicas de laboratório Elizângela, Rosane e a doutoranda Nessana Dartora, Departamento de Bioquímica - UFPR, pelas análises de HPSEC e GC-MS. Ao Tiago Pedrozo, Departamento de Química - UFPR, pela ajuda nas análises de FT-IR.

Ao Herculano S. Reis Filho, do laboratório de histotecnologia, Departamento de Biologia Celular - UFPR, pelos corantes.

Aos meus colegas da turma de mestrado 2012-2014. Gostaria de falar um pouquinho de cada um, mas este agradecimento ia ficar longo demais. Quantos momentos sofremos juntos, mas que por sorte foram poucos pertos dos divertidos e de ajuda mútua. Como também aos demais amigos, doutorando e pós-doutorando que fiz no departamento de Bioquímica, muito bom ter encontrado vocês.

A uma das melhores pessoas que conheço, Ms. Axel Helmut Rulf Cofré. Obrigada por todos os artigos passados, mesmo vocês estando longe, e pelos anos de amizade.

As minhas melhores e amadas amigas, Raisa M. de Oliveira e Luciana de Paula, desculpa a ausência durante esse período e obrigada por todos os anos de amizade. Amo vocês, tanto quanto as minhas fiéis amigas da faculdade, Mariana C.

Feres, Fabiane Beatrice, Caroline C. Barboza, Lívia B. M. Graf, Fernanda P. Januário, Bárbara Sbalqueiro e Ledyane D. Rocha. Apesar de cada uma ter parado em um canto diferente, vocês moram no meu coração e vamos ser as *azoitas* para sempre!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica pela oportunidade e incentivo. Ao Prof. Dr. Miguel D. Noseda e a Profª Drª Silvia M. S. C. Cadena, ex e atual coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica e aos demais professores do Programa, por todo ensinamento repassado.

A Unidade Gestora do Fundo Paraná (Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior - Gov. PR (UGF/SETI/Gov. PR), PRONEX-Carboidratos (CNPq/Fundação Araucária) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Por fim, para todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram com este trabalho. Muito obrigada.

*Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder, o bem que poderíamos ganhar, por medo de tentar.*

William Shakespeare

**RESUMO**

*Abelmoschus esculentus* L. Moench (quiabo) é uma planta nativa da África e amplamente utilizada na culinária e na medicina tradicional. Dados da literatura sugerem que suas propriedades biológicas são decorrentes do seu alto conteúdo de polissacarídeos, que formam soluções extremamente viscosas. O presente estudo apresentou como objetivo geral caracterizar quimicamente as frações obtidas dos frutos de *A. esculentus*, bem como, avaliar as atividades imunomoduladora e antioxidante destas frações utilizando, respectivamente, o modelo experimental de células de lavado peritoneal de camundongos SWISS e testes antioxidantes, ambos *in vitro*. As frações ricas em carboidratos obtidas por meio de extrações sequenciais aquosas (W-1, W-2, W-3, W-4, HW) e com ácido cítrico [0.1Ca, 0.1 Ca(2), 1Ca, 1Ca(2)], ambas e em diferentes condições, geraram várias frações viscosas em água. Estas frações apresentam-se constituídas, majoritariamente, por GalA, Gal e Rha, na proporção média de 58:25:10. Todas as frações apresentam alto conteúdo de grupamento acetil (18,2%±1,1), baixo teor de proteínas (2,4%±0,5) e compostos fenólicos (0,3%±0,04). Através do ensaio utilizando o reagente de Yariv (β-glucosil) foi demonstrado, que todas as frações apresentaram cerca de 1% de arabinogalactana-proteinas. Através das análises em espectroscopia de infravermelho, pode-se observar que todas as frações, exceto a extraída com ácido cítrico a 1% (m/v) em banho-fervente - 1Ca(2), apresentam grandes quantidades de grupamentos carboxilas livres, e em menor proporção carboxilas esterificadas, que juntamente com a dosagem colorimétrica de urônicos totais, demonstram que as frações são constituídas, em maior parte, por polissacarídeos ácidos. A fração W-1 (1ª extração aquosa, 25 ºC) foi analisada também por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Com os resultados obtidos, e as informações contidas na literatura, sugere-se que a fração W-1 é uma ramnogalacturonana tipo I acetilada, apresentando como cadeia principal uma estrutura de -2)-α-Rha-(1→4)-α-GalA-(1→2)-α-Rha-(1→4)-α-GalA-(1-. As unidades de Rha e GalA poderiam estar acetiladas em *O*-3. Além disso, às unidades de Rha estariam substituídas por unidades de α-Gal as quais estariam ligada em *O*-4 formando as cadeias laterais. A análise da atividade imunomoduladora foi realizada com fração W-1. Esta fração não apresentou citotoxicidade e induziu a produção de NO nas condições testadas. Além disso, as análises morfológicas dos macrófagos incubados na presença de W-1 também confirmaram que esta fração apresentou a capacidade de modular a atividade imunomoduladora *in vitro*. Quanto à atividade antioxidante, nenhuma das frações testadas apresentou atividades significantes comparando com padrões comerciais, frente aos testes de formação do complexo fosfomolibdênio, de reação a espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) bem como para a atividade quelante de íons ferroso.

**Palavras-chave**: *Abelmoschus esculentus*, Malvaceae, mucilagem, pectinas, ramnogalacturonana tipo I, imunomoduladora, interleucinas, estresse oxidativo, TBARS.

**ABSTRACT**

*Abelmoschus esculentus* L. Moench (okra) is a native plant from Africa broadly used in culinary and traditional medicine. Literature data sugests your biological properties are decurrent of it high polysaccharides, wich form extremely viscous solutions. The present study had as main objective, chemically characterize the fractions obtained from the *A. esculentus* fruits, and also evaluate the immunomodulatory and antioxidant activities of these fractions using, respectively, the peritoneal lavage experimental cell model of SWISS mouses and antioxidants tests, both *in vitro.* The carbohydrates rich fractions obtained by the sequential aqueous extractions (W-1, W-2, W-3, W-4, HW) and citric acid [0.1Ca, 0.1Ca(2), 1Ca, 1Ca(2)], both in different conditions, generated several viscous fractions in water. Fractions are presented consist of mostly taken by GalA, Gal and Rha, in medium proportion of 58:25:10. All the fractions presented high content of acetyl grouping (18,2%±1,1), low protein content (2,4%±0,5) and phenolic compounds (0,3%±0,04). Trough trial using the Yariv reagent (β-GlcY) was demonstrated that all fractions showed about 1% arabinogalactan-proteins. Through the analyzes of IR spectroscopy, it can be seen that all the fractions, except extracted with citric acid (1% m/v) in boiling water bath - 1Ca(2), have large amounts of free carboxyl groups and a lesser proportion esterified carboxyl, which together with the colorimetric determination of total uronic demonstrate that the fractions are formed in most part by acidic polysaccharides. W-1 (1st aqueous extraction, 25 ° C) fraction was also analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. With the results, and the information contained in the literature, it is suggested that the fraction W-1 is a rhamnogalacturonan type I acetylated, with the main chain structure of -2)-α-Rha-(1→4)-α-GalA-(1→2)-α-Rha-(1→4)-α-GalA-(1-. The units of Rha and GalA could be acetylated at O-3. Furthermore, the units of Rha were replaced by units which α-Gal were linked in the 4-forming side chains. Analysis of immunomodulatory activity was carried out with fraction W-1. This fraction showed no cytotoxicity and induce the production of NO on tested conditions. Furthermore, the morphological analysis of macrophages incubated in the presence of W-1 also confirmed that this fraction showed the ability to modulate the immunomodulatory activity in vitro. For antioxidant activity, none of fractions tested showed significant activity in comparison with commercial standard, compared to the tests phosphomolybdenum complex formation, reaction with thiobarbituric acid reactive species (TBARS) as well as the ferrous ion chelating activity.

**Palavras-chave:** *Abelmoschus esculentus*, Malvaceae, mucilage, pectins, rhamnogalacturonan type I, immunomodulatory, interleukines, oxidative stress, TBARS.

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES NA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DAS PLANTAS ..... 29
**FIGURA 2** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES NAS MOLÉCULAS DE CELULOSE ..... 31
**FIGURA 3** - MODELO PROPOSTO PARA DISSACARÍDEOS DE HEMICELULOSE ..... 32
**FIGURA 4** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM PECTINAS ..... 33
**FIGURA 5** - MODELO PROPOSTO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE UMA HOMOGALACTURONANA ..... 34
**FIGURA 6** - MODELO PROPOSTO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE APIOGALACTURONANAS E XILOGALACTURONANAS ..... 35
**FIGURA 7** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA RAMNOGALACTURONANA DO TIPO I ..... 36
**FIGURA 8** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA RAMNOGALACTURONANA DO TIPO II ..... 38
**FIGURA 9** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA ARABINANA ..... 39
**FIGURA 10** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA ARABINOGALACTANA DO TIPO I ..... 39
**FIGURA 11** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA ARABINOGALACTANA DO TIPO II ..... 40
**FIGURA 12** - MODELO HIPOTÉTICO DE UMA MOLÉCULA DE AGP ..... 41

**FIGURA 13** - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *Abelmoschus* ..... 42
**FIGURA 14** - DETALHES DAS FLORES E FRUTOS DO *Abelmoschus esculentus* L. Moench..... 43
**FIGURA 15** - MODELO PROPOSTO DA RESPOSTA GERAL DO SISTEMA IMUNOLÓGICO ATIVADO POR POLISSACARÍDEOS MRBs ..... 57
**FIGURA 16** - MODELO PROPOSTO DA RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO POR POLISSACARÍDEOS MRBs ..... 58
**FIGURA 17** - DETALHES DAS ESTRUTURAS PRESENTES NOS FRUTOS DE *A. esculentus*..... 63
**FIGURA 18** - PROCESSAMENTO DAS SEMENTES, DOS PEDÚNCULOS E DOS FRUTOS DE *A. esculentus*..... 64
**FIGURA 19** - FLUXOGRAMA DO PRODECIMENTO DE DESLIPIDIFICAÇÃO SEQUENCIAL REALIZADOS NOS FRUTOS DE *A. esculentus*..... 64
**FIGURA 20** - FLUXOGRAMA DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS REALIZADAS NOS FRUTOS DE *A. esculentus*..... 66
**FIGURA 21** - MODELO ESQUEMÁTICO DA DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS NA PLACA DE GEL AGAROSE CONTENDO β-GlcY ..... 71
**FIGURA 22** - MODELO PROPOSTO PARA A REDUÇÃO DO MTT POR ENZIMAS MITOCONDRIAIS ..... 80
**FIGURA 23** - FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS PROVENIENTES DOS FRUTOS DE *A. esculentus*..... 82
**FIGURA 24** - PERFIL MONOSSACARÍDICO OBTIDO EM CROMATOGRAFRIA DE CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE *A. esculentus* ..... 95
**FIGURA 25** - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À DETECTOR DE PULSO AMPEROMÉTRICO..... 97

**FIGURA 26** - GEL DE AGAROSE COM O REGANETE β-GlcY PARA DETECÇÃO DE AGPs DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DOS FRUTOS DE *A. esculentus* ..... 99
**FIGURA 27** - MODELO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO β-GlcY..... 100
**FIGURA 28** - PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES W-1, W-2 E W-3 OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus* ..... 102
**FIGURA 29** - PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES W-4, HW E 0.1Ca OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus* ..... 103
**FIGURA 30** - PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES 0.1Ca(2), 1Ca E 1Ca(2) OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*..... 104
**FIGURA 31** - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES W-1, W-2 E W-3 OBTIDAS DOS FRUTOS *DE A. esculentus*..... 108
**FIGURA 32** - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES W-4, HW E 0.1Ca OBTIDAS DOS FRUTOS *DE A. esculentus*..... 109
**FIGURA 33** - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES 0.1Ca(2), 1Ca E 1Ca(2) OBTIDAS DOS FRUTOS *DE A. esculentus* ..... 110
**FIGURA 34** - ESPECTROS DE $^{1}$H-RMN (400 MHz) DA FRAÇÃO W-1 OBTIDA DOS FRUTOS DE *A. esculentus*..... 112
**FIGURA 35** - ESPECTROS DE CORRELAÇÃO ($^{13}$C, $^{1}$H) - HSQC DA FRAÇÃO W-1 OBTIDA DOS FRUTOS DE *A. esculentus*..... 113
**FIGURA 36** - EFEITO DO TRATAMENTO DE 24 H COM A FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 116

**FIGURA 37** - EFEITO DO TRATAMENTO DE 24 H COM A FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 117
**FIGURA 38** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS TRATAMENTO DE 24 E 48 H SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS SWISS ..... 118
**FIGURA 39** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 48H DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 120
**FIGURA 40** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24H DE TRATAMENTO SOBRE A CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE LISOSSOMOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 123
**FIGURA 41** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24H DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1β POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 125
**FIGURA 42** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24H DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF-α POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 126
**FIGURA 43** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24h DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 127
**FIGURA 44** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24h DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-10 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 128

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DO *Abelmoschus esculentus* ..... 43
**TABELA 2** - INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS ENCONTRANDAS NOS FRUTOS, FOLHAS E SEMENTES DE *A. esculentus* ..... 44
**TABELA 3** - *A. esculentus* NA MEDICINA TRADICIONAL ..... 46
**TABELA 4** - PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA IMUNIDADE INATA ..... 49
**TABELA 5** - PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA IMUNIDADE ADAPTATIVA ..... 50
**TABELA 6** - PRINCIPAIS FUNÇÕES DAS CITOCINAS ..... 56
**TABELA 7** - POLISSACARÍDEOS VEGETAIS COM ATIVIDADE IMUNOMODULADORA ..... 59
**TABELA 8** - POLISSACARÍDEOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ..... 62
**TABELA 9** - RENDIMENTO DO MATERIAL APÓS SECAGEM E DESLIPIDIFICAÇÃO ..... 88
**TABELA 10** - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus* ..... 90
**TABELA 11** - TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS, PROTEÍNAS TOTAIS, COMPOSTOS FENÓLICOS E GRUPAMENTOS ACETIL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus* ..... 92
**TABELA 12** - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE *A. eculentus* ..... 96
**TABELA 13** - CONTEÚDO DE AGPs PRESENTE NAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus* ..... 99
**TABELA 14** - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DESENVOLVIDAS PELAS CITOCINAS IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-10 ..... 129

**TABELA 15 -** EFEITO DA FRAÇÃO W-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS ..... 130

**TABELA 16 -** ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE TODAS AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DE FRUTOS DE *A. esculentus*..... 134

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| α | Denotação da anomericidade alfa |
| β | Denotação da anomericidade beta |
| δ | Deslocamento químico (delta) |
| nm | Nanômetros |
| v/v | Volume por volume |
| m/v | Massa por volume |
| h | Horas |
| min. | Minutos |
| AC | Anticorpos |
| AG | Arabinogalactanas |
| AG-I | Arabinogalactanas do tipo I |
| AG-II | Arabinogalactanas do tipo II |
| AGP | Arabinogalactana-proteína |
| APC | Células apresentadoras de antígenos |
| Api*f* | Apiose furanosídica |
| Ara*f* | Arabinose furanosídica |
| ARR% | Atividade antioxidante relativa a do ácido ascórbico |
| BHT | Butil hidroxitolueno |
| ELISA | *Enzyme-linked immunosorbent assay* |
| ER | Espécies reativas |
| ERNs | Espécies reativas do nitrogênio |
| EROs | Espécies reativas ao oxigênio |
| Fuc*p* | Fucose piranosídica |
| Gal*p* | Galactose piranosídica |
| Gal*p*A | Ácido galacturônico piranosídico |
| GlcN | Glucosamina |
| Glc*p* | Glucose piranosídica |
| Glc*p*A | Ácido glucurônico piranosídico |
| HG | Homogalacturonanas |
| HSQC | Espectroscopia de ressonância bidimensional HSQC ($^{13}C/^{1}H$) |
| IA % | Índice antioxidante |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleucinas |

| | |
|---|---|
| LPS | Lipopolissacarídeo bacteriano |
| Man*p* | Manose piranosídica |
| MRBs | Polissacarídeos modificadores da resposta biológica |
| MTT | Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazil-2il]-2,5 difeniltetrazólio |
| NO• | Óxido nítrico |
| PBS | Solução salina tamponada |
| Q % | Percentagem da capacidade quelante |
| RG-I | Ramnogalacturonanas do tipo I |
| RG-II | Ramngalacturonanas do tipo II |
| Rha*p* | Ramnose piranosídica |
| RMN $^{1}$H | Espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional da próton |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBARS | Ensaio antioxidante *in vitro* das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TFA | Ácido trifluoracético |
| TLR | Receptores *Toll-like* |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| XG | Xiloglucanas |
| XGA | Xilogalacturonanas |
| Xyl*p* | Xilose piranosídica |
| β-GlcY | Reagente Yariv β-glucosil |
| W-1 | Fração polissacarídica obtida da primeira extração aquosa à temperatura ambiente |
| W-2 | Fração polissacarídica obtida da segunda extração aquosa à temperatura ambiente |
| W-3 | Fração polissacarídica obtida da terceira extração aquosa à temperatura ambiente |
| W-4 | Fração polissacarídica obtida da quarta extração aquosa à temperatura ambiente |
| HW | Fração polissacarídica obtida da extração aquosa à quente (60 ºC) |
| 0.1Ca | Fração polissacarídica obtida da primeira extração com ácido cítrico (0,1% - m/v- e 60 ºC) |
| 0.1Ca(2) | Fração polissacarídica obtida da segunda extração com ácido cítrico (0,1% - m/v - e banho-fervente) |
| 1Ca | Fração polissacarídica obtida da terceira extração com ácido cítrico (1% - m/v - e 60 ºC) |
| 1Ca(2) | Fração polissacarídica obtida da quarta extração com ácido cítrico (1% - m/v - e banho-fervente) |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO ..... 21**
**2 JUSTIFICATIVA ..... 23**
**3 OBJETIVOS ..... 24**
3.1 OBJETIVO GERAL ..... 24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 24
**4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 25**
4.1 PLANTAS MEDICINAIS ..... 25
4.2 CONSTITUINTES BIOTIVOS ..... 27
4.3 PAREDE CELULAR DE PLANTAS ..... 28
4.3.1 Polissacarídeos e glicoconjugados presentes na parede células das plantas ..... 30
4.3.1.1 Celuloses e hemiceluloses ..... 30
4.3.1.3 Pectinas ..... 32
4.3.1.3.1 Elementos estruturais que podem estar presentes nas pectinas ..... 33
a) Homogalacturonanas ..... 33
b) Apiogalacturonanas e Xilogalacturonanas ..... 34
c) Ramnogalacturonanas do tipo I ..... 35
d) Ramnogalacturonanas do tipo II ..... 37
e) Arabinanas ..... 38
f) Arabinogalactanas do tipo I e II ..... 39
4.3.1.4 Arabinogalactanas-proteínas ..... 40
4.4 *Abelmoschus esculentus* L. (Moench) ..... 42
4.4.1 Características gerais ..... 42
4.4.2 Utilização medicinal ..... 44
4.4.3 Polissacarídeos de *A. esculentus* ..... 46
4.4.3.1 Breve histórico científico sobre a caracterização química dos polissacarídeos presentes na mucilagem dos frutos de *Abelmoschus esculentus* ..... 47
4.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS ..... 48

4.5.1 Conceitos básicos sobre o sistema imunológico ..... 48
4.5.1.1 Macrófagos ..... 51
4.5.1.2 Citocinas ..... 52
4.5.1.3 Polissacarídeos vegetais com atividades biológicas sobre o sistema imunológico ..... 56
4.5.2 Conceitos básicos de estresse oxidativo ..... 60
4.5.2.1 Polissacarídeos e a atividade antioxidante ..... 61
**5 MATERIAIS E MÉTODOS ..... 63**
5.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS FRUTOS DE *Abelmoschus esculentus* ..... 63
5.2 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus* ..... 65
5.2.1 Extrações aquosas ..... 65
5.2.2 Extrações com ácido cítrico ..... 65
5.3 ANÁLISES QUÍMICAS ..... 67
5.3.1 Dosagens colorimétricas ..... 67
5.3.1.1 Carboidrato total ..... 67
5.3.1.2 Ácidos urônicos ..... 68
5.3.1.3 Proteína total ..... 68
5.3.1.4 Compostos fenólicos ..... 69
5.3.1.5 Grupamento acetil ..... 70
5.3.2 Ensaio de difusão radial em gel de agarose com reagente Yariv β-glucosil (*Single diffusion*) ..... 70
5.3.3 Análises cromatográficas ..... 71
5.3.3.1 Cromatografia de camada delgada (CCD) ..... 71
5.3.3.2 Cromatografia de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALLS/RI) ..... 72
5.3.3.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) ..... 73
a) Composição monossacarídica neutra ..... 73
5.3.3.4 Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada à detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) ..... 74
5.3.4 Análises espectroscópicas ..... 74

5.3.4.1 Espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR) ..... 74
5.3.4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear monodimensional ($^{1}H$) e bidimensional ($^{1}H/^{13}C$-HSQC) ..... 75
5.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS - Ensaios *in vitro* ..... 75
5.4.1 Imunomodulação ..... 75
5.4.1.1 Reagentes ..... 75
5.4.1.2 Material e equipamentos ..... 76
5.4.1.3 Soluções ..... 77
5.4.1.4. Animais ..... 78
5.4.1.5 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ..... 79
5.4.1.6 Determinação da viabilidade celular através do método do MTT ..... 80
5.4.1.7 Dosagem do óxido nítrico através do reagente de Griess ..... 81
5.4.1.8 Avaliação da retenção de lisossomos através do método do vermelho neutro ..... 82
5.4.1.9 Dosagem de citocinas produzidas pela cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ..... 82
5.4.1.10 Análises morfológicas de macrófagos de camundongos Swiss ..... 84
5.4.2 Ensaios Antioxidantes ..... 84
5.4.2.1 Ensaio antioxidante da formação do complexo fosfomolibdênio ..... 84
5.4.2.2 Ensaio antioxidante do método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico ..... 85
5.4.2.3 Ensaio antioxidante da capacidade de quelação de íons ferroso ..... 86
5.4.3 Análises estatísticas ..... 87
**6 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 88**
6.1 OBTENÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DE FRUTOS DE *Abelmoschus esculentus* L. Moench ..... 88
6.2 ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus* ..... 91
6.2.1 Dosagens colorimétricas para determinação do conteúdo de carboidrato total, proteína total, compostos fenólicos e grupamento acetil ..... 91

6.2.2 Determinação da composição monossacarídica neutra ..... 94
6.2.3 Dosagem de arabinogalactanas-proteína..... 98
6.2.4 Análise de homogeneidade ..... 101
6.2.5 Análise em espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier..... 106
6.2.6 Análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear monodimensional ($^{1}H$) e bidimensional ($^{1}H/^{13}C$-HSQC) da fração W-1..... 111
6.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* ..... 114
6.3.1 Atividade imunomoduladora da fração W-1 obtida dos frutos de *A. esculentus* ..... 114
6.3.1.1 Análises morfológicas..... 114
6.3.1.2 Efeito da fração W-1 sobre a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ..... 117
6.3.1.3 Efeito da fração W-1 sob a produção de NO• em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ..... 119
6.3.1.4 Efeito da fração W-1 sobre a capacidade de retenção de lisossomos por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss..... 122
6.3.1.5 Efeito da fração W-1 sobre a produção de citocinas em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ..... 124
6.3.2 Ensaios antioxidantes..... 133
**7 CONCLUSÕES ..... 138**
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 140**
**ANEXOS ..... 155**

# 1 INTRODUÇÃO

Relatos demonstram que as plantas acompanham o homem ao longo do tempo. Sua utilização engloba tanto fins alimentícios quanto terapêuticos, pois estes vegetais apresentam uma rica mistura de compostos químicos diferentes. Com o avanço científico, principalmente através da fitoquímica, os componentes químicos vegetais vêm sendo isolados e estudados quanto às suas potentes propriedades medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; GURIB-FAKIM, 2006).

A parede celular vegetal compreende uma estrutura complexa e dinâmica que executa uma séries de funções vitais para o desenvolvimento da planta. De modo geral, ela é composta por carboidratos, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Várias avaliações durante os dez últimos anos demonstraram que muitas plantas apresentam polissacarídeos bioativos com propriedades terapêuticas (PAULSEN; BARSETT, 2005; MELLINGER *et al*., 2008). Diferentes polissacarídeos isolados de plantas, utilizadas na medicina tradicional, já foram identificados e avaliados quanto as suas ações sob o sistema imunológico *in vitro*. Estudos com arabinanas, arabinogalactanas, ramnogalactanas e ramnogalacturonanas demonstram que estas apresentam atividade sobre o sistema complemento humano. Polissacarídeos semelhantes, também têm mostrado efeito sobre macrófagos, linfócitos T e células NK murinas (NEGARD *et al.,* 2004; PAULSEN; BARSETT, 2005).

O *Abelmoschus esculentus* L. Moench, popularmente conhecido como quiabo, é uma planta originária da África e, nos dias atuais, é amplamente cultivada em todas as regiões tropicas e subtropicais do mundo (OWOLARAFE; SHOTONDE, 2004; SENGKHARPARN *et al.,* 2009a; BENCHASRI, 2012).

As fibras das suas hastes vêm sendo utilizadas industrialmente para confecção de papel, cordas e como substituto da fibra juta (obtida de plantas da família Tilioideae). Os frutos são amplamente utilizados na culinária por serem uma rica fonte de minerais, proteínas, lipídeos e carboidratos (EJECHI; OJEATA; OYELEKE, 1997; OWOLARAFE; SHOTONDE, 2004; VWIOKO; OSAWARU; ERUGUN, 2008; BENCHASRI; DERAMAER, 2010; KHOMSUG *et al.,* 2010; JAIN *et al.,* 2012).

Além dos aspectos industriais e alimentícios, a planta como um todo também é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de disúria, furúnculos, febre e

problemas pulmonares em geral (NDJOUENKEU; AKINGBALA; OGUNTIMEIN, 1997; GÜRBÜZ *et al.,* 2003; VAN DEN BROEK *et al.,* 2002; ATAWODI *et al*., 2009; SILVA, 2006; ALONSO, 2007; VWIOKO; OSAWARU; ERUGUN, 2008; JAIN *et al*., 2012; FAN *et al.,* 2013).

A mucilagem produzida pelo *A. esculentus* desperta grande interesse tanto industrial como farmacêutico. Na literatura existem trabalhos que tentam elucidar os seus componentes químicos, bem como, as suas atividades biológicas. Estes relatos demonstram que moléculas presentes na mucilagem, de *A. esculentus*, atuam sobre o sistema complemento humano (TOMODA *et al*., 1989) e ainda apresentam propriedades antidiabética (TOMODA *et al.,* 1989; URAKU *et al*., 2011), hipolipidêmica (NGOC *et al*., 2008), neuroprotetora (TONGJAROENBUANGAM *et al.,* 2011) e antioxidante (ADELAKUM *et al*., 2009; KHOMSUG *et al*., 2010; SABITHA *et al*., 2012). Entretanto, pouco se sabe sobre a atividade biológica destes componentes frente ao sistema imunológico, em especial sobre os macrófagos.

Os diversos estudos envolvendo o isolamento e a caracterização de moléculas presentes na mucilagem de *A. esculentus* utilizaram, em grande parte, apresentam tratamentos drásticos para clivagem das ligações covalentes para liberação dos polímeros. Estas condições podem também libertar outros polímeros da parede celular, desta forma, dificultando a elucidação dos componentes em questão.

## 2 JUSTIFICATIVA

Existem diversos estudos científicos comprovando as propriedades biológicas de plantas utilizadas da medicina tradicional. Dentre os compostos isolados destas espécies vegetais, os polissacarídeos, em especial as pectinas, vêm apresentando grande potencial para o uso como agentes farmacológicos no tratamento de disfunções do sistema imunológico e bem como sobre o estresse oxidativo.

Sabe-se que os frutos de *A. esculentus* são ricos em mucilagem, sendo esta, uma excelente fonte de polissacarídeos. Na literatura existem diversos trabalhos sobre a caracterização química e estrutural dos componentes presentes na mucilagem desta espécie (WHISTLER; CONRAD, 1954a, b; AMIN, 1956; KELKAR; INGLE; BHIDE, 1962; KISHIDA; FUKUI, 1967; WOOLFE; CHAPLID; OTCHERE, 1977; TOMODA *et al.*, 1980; LENGSFELD *et al.*, 2004; DETERS; LENGSFELD; HENSEL, 2005; SENGKHAMPARN, 2009a), porém a elucidação química exata está longe de ser completa. Há uma grande divergência entre os resultados apresentados pelos autores e este fato, provavelmente, pode estar relacionado pelos métodos evasivos utilizados na extrações dos polissacarídeos e/ou a utilização de variedades diferentes da espécie (SENGKHAMPARN, 2009).

Apesar do grande interesse sobre a composição química dos componentes presentes na mucilagem dos frutos de *A. esculentus*, pouco se sabe sobre as suas propriedades biológicas e novas formas de terapêuticas complementares para o tratamentos de diferentes patologias são de extrema importância para a saúde. Desta forma, pesquisas que abordem estratégias experimentais que possibilitem a caracterização de imunomoduladores e de antioxidantes naturais são de extrema relevância bem como das que possam correlacionar o tipo de estrutura química das frações e/ou compostos testados com os efeitos biológicos apresentados.

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar as frações polissacarídicas obtidas dos frutos de *Abelmoschus esculentus* L. Moench e avaliar suas atividades imunomoduladora e antioxidante, utilizando modelos experimentais *in vitro*.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar e isolar os polissacarídeos presentes nos frutos de *A. esculentus* L. Moench por extrações aquosas e com ácido cítrico, em diferentes condições;
- Caracterizar quimicamente as frações obtidas utilizando métodos químicos e espectroscópicos;
- Avaliar, *in vitro*, o efeito imunomodulador das frações frente ao modelo experimental de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade antioxidante de todas as frações obtidas.

# 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 4.1 PLANTAS MEDICINAIS

A biodiversidade descreve a quantidade, variedade e a variabilidade de seres vivos ao nível de organização biológica. Ela pode ser analisada através do seu papel evolutivo, ecológico ou como um recurso biológico (CHIVIAN; BERNSTEIN, 2010). O termo ‘recurso biológico’ refere-se aos componentes da biodiversidade que têm alguma utilização direta, indireta ou potencial para a humanidade (LÉVÊQUE, 1999).

O conhecimento sobre as plantas vem acompanhando o homem através das gerações e a sua utilização é encontrada em praticamente todas as civilizações antigas. Acredita-se que até mesmo os Neandertais, há 60.000 anos, já apresentavam algum conhecimento sobre plantas, devido a depósitos de pólen encontrado em suas sepulturas (SOLECKI, 1975). Outros relatos históricos demonstram que mesmo antes da escrita, as civilizações utilizavam as plantas não somente como alimentos, mas também, para o controle de pragas, alívio e cura de doenças (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; VIEGAS-JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; BARRETO, 2011) através de drogas ‘brutas” que incluíam tinturas, chás, emplastos, pós e outras formulações a base de plantas (BALUNAS e KINGHOM, 2005).

O conhecimento primordial sobre qual planta utilizar provavelmente veio da análise do comportamento dos animais que conseguem diferenciar as úteis das tóxicas (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006). E todas as informações adquiridas foram passadas como herança dos antepassados que, através da forma tradicional, dissiparam o conhecimento, oralmente, através das gerações (BARRETO, 2011). Com o surgimento da escrita, essas informações foram compiladas e os primeiros registros escritos que se tem notícia são placas de barro em caracteres cuneiformes (Mesopotâmia), dados sumérios e babilônicos e uma obra chinesa intitulada *Pen Ts’ao*, de Shen Nung (*The Herbal* ou A grande fitoterapia), que remontam de cerca de 3000 a 2600 a.C. Nesses dados encontram-se relatos, por exemplo, de óleos de cedro (espécies do gênero *Cedrus*) e cipreste (*Cupressus sempervirens* L.), alcaçuz (*Glycyrrhia glabra* L.), mirra (espécies do gênero *Cammiphora*) e papoula (*Papaver somniferum* L.), as quais ainda estão em

uso para o tratamento de várias doenças, como por exemplo, tosse, resfriado, infecções parasitárias e inflamações (CUNHA, 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

A fitoterapia é caracterizada pelo tratamento com o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de princípios ativos isolados. Os fitoterápicos são os medicamentos produzidos a partir destas plantas e o seu termo é derivado de um saber erudita, cujo axioma popular, denomina-se “uso de folhas, plantas ou ervas de chá” (SILVA *et al.,* 2007; FIRMO *et al*., 2011).

Atualmente, uma planta é considerada medicinal quando apresenta, em um ou em mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins medicinais ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos. Atualmente, estas substâncias representam mais de 50% de todos os medicamentos usados mundialmente (WHO, 1998; GURIB-FAKIM, 2006). A busca pelo seu conhecimento continua a exercer um grande fascínio até os dias de hoje e isso é comprovado pelo grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas apresentam, tipicamente, uma mistura de compostos químicos diferentes. A fitoquímica vem caracterizando e isolando moléculas bioativas que apresentam potenciais chances de virem a ser empregadas como agentes medicinais (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; GURIB-FAKIM, 2006). Um exemplo desse fato é a morfina, substância derivada do ópio (Papoula - *P. somniferum* L.), que foi um dos primeiros composto ativos isolados (início do século 19) e é utilizada até os dias atuais (BALUNAS; KINGHOM, 2005).

Apesar de todo o avanço tecnológico e cientifico sobre as plantas medicinais, a sua utilização no âmbito tradicional, ainda é de grande importância. Estima-se que 70% a 80% da população mundial ainda dependa da medicina tradicional para os cuidados primários da saúde. Esse fato é extremamente comum nos países em desenvolvimento, os quais não possuem condições financeiras para a importação de medicamentos sintéticos (GURIB-FAKIM, 2006; UPRETY *et al.,* 2012).

Além da importância terapêutica nesses países, as plantas ainda contribuem para a renda de muitas famílias, que sobrevivem do cultivo e comercialização. O comércio mundial destes produtos movimenta aproximadamente US$ 22 bilhões anuais (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; UPRETY *et al.,* 2012).

Desta forma, as plantas medicinais são uma importante ferramenta na promoção da saúde, renda e cultura em muitas comunidades mundiais. Todas as

ciências que as estudam, são de extrema utilidade, pois desta forma colaboram com a elucidação das ações farmacológicas, bem como, na melhor forma de utilizá-las.

## 4.2 CONSTITUINTES BIOATIVOS

As plantas são uma rica fonte de substâncias bioativas e a associação com o conhecimento presente na medicina tradicional, tem contribuído para a obtenção de novos produtos que podem ser utilizados como matéria-prima para aplicações científicas, tecnológicas e comerciais (BALANDRIN *et al*., 1985; FOGLIO *et al.,* 2006; BRANDÃO *et al*., 2010). Os compostos presentes nas plantas, por convenção, podem ser classificados em metabólitos primários (ou essenciais) ou secundários (ou especiais).

No metabolismo primário, encontram-se substâncias amplamente distribuídas em todas as plantas e que são responsáveis por processos metabólitos que desempenham atividades vitais, tais como: fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Resumidamente, estas moléculas proporcionam funções essenciais para a sobrevivência, o desenvolvimento e a reprodução das plantas. Dentro desse grupo, encontram-se moléculas como: as proteínas, os nucleotídeos, os citocromos, os lipídeos, a clorofila e os polissacarídeos (BRISKIN, 2000; BRANDÃO *et al.,* 2010).

Produzidos a partir das moléculas do metabolismo primário, os produtos do metabolismo secundário são caracterizados por apresentarem estruturas complexas, baixa massa molecular e distintas atividades biológicas. Estas moléculas estão em concentrações reduzidas nas plantas, geralmente restritos a grupos taxonômicos específicos e a sua distribuição não é universal em todos as plantas. Embora sua função não seja essencial para a planta completar o seu ciclo de vida, como os produtos do metabolismo primário, essas moléculas desempenham importantes papéis na relação da planta com seu meio, gerando vantagens na perpetuação da espécie. Dentro da ação com o ambiente, estes elementos podem atuar como atrativos de polinizadores, adequadores químicos a estresse biológico e defensores químicos contra microrganismos, insetos, predadores maiores e até mesmo outras plantas (BALANDRIN *et al.,* 1985; BRANDÃO *et al.,* 2010).

Existem três grandes grupos, distintos quimicamente, de metabólitos secundários: os terpenos, que são sintetizados a partir do ácido mevalônico, piruvato

ou 3-fosfoglicerato; os compostos fenólicos, derivados do ácido chiquímico ou mevalônico; e os alcaloides, que são substâncias derivadas de aminoácidos aromáticos e alifáticos (PERES, 2004).

## 4.3 PAREDE CELULAR DE PLANTAS

A parede celular das plantas compreende uma estrutura complexa e dinâmica que executa uma série de funções essenciais. Essa estrutura proporciona forma às células, bem como a interface com as células adjacentes, proporcionando a comunicação intercelular. Devido a sua localização superficial na célula, também desempenham papéis na interação plantas-microrganismos, na defesa contra possíveis patógenos e variações adversas ambientais, além de ser a fonte de carbono orgânico mais abundante do planeta (CAFFALL; MOHNEN, 2009; KEEGSTRA, 2010; GILBERT, 2010).

De modo geral, ela é composta por polissacarídeos, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos e a sua estrutura é continuamente modificada para acomodar os estágios de desenvolvimento da célula e condições ambientais (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Por convenção esta estrutura pode ser dividida em duas categorias: paredes primárias e secundárias.

A parede celular primária é caracterizada por ser uma estrutura forte, porém flexível, a qual regula a velocidade e direção da expansão celular. Estabelece o tamanho e a forma final da célula, além de contribuir para a adesão celular, integridade estrutural e transdução de sinais (FRY, 2004; KEEGSTRA, 2010).

Essas paredes, juntamente com as lamelas médias, são formadas durante as fases iniciais do crescimento e expansão celular. São compostas em menor parte, por proteínas, glicoproteínas e compostos químicos como, suberina, cutina e sílica. Sua maior proporção é dado pelos polissacarídeos, que estão divididos em três categorias principais: celulose, hemicelulose e pectinas (FRY, 2003; CAFFALL; MOHNEN, 2009; KEEGSTRA, 2010; GILBERT, 2010).

É postulado que a arquitetura da parede é dada pelas interações, através de ligações de hidrogênio, entre microfibrilas de celulose e hemicelulose, que juntamente com a pectina, formam uma matriz (FIGURA 1). Porém, ainda pouco se

sabe como as pectinas interagem com outras moléculas (FRY, 2004; PÉREZ; MAZEAU, 2005; CAFFALL; MOHNEN, 2009; KEEGSTRA, 2010; GILBERT, 2010).

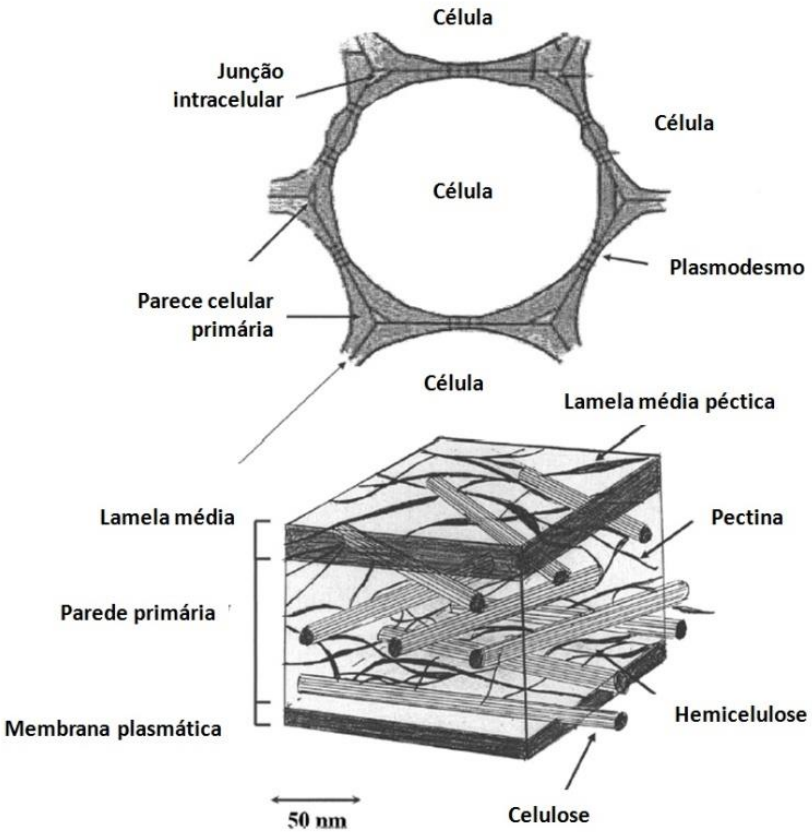



**FIGURA 1** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES NA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DAS PLANTAS
FONTE: PÉREZ; MAZEAU (2005).

Essa arquitetura é rompida e/ou dispostas para fora, quando as células crescem e se diferenciam, pois novos polissacarídeos são inseridos e mesclados com os existentes perto da membrana, gerando uma composição ou arquitetura não uniforme em toda a parede. Esse processo possui importância biológica, que pode ser explicado utilizando as pectinas como exemplo. Esses polímeros são projetados para serem depositados primeiramente após a divisão celular, desta forma, gerando uma região rica em pectinas que une as paredes primárias das células, chamadas de lamela média, enquanto os outros componentes são depositados posteriormente. A heterogeneidade da parede celular pode ser importante para componentes proteicos e glicoproteínas, como as arabinogalactanas-proteínas (AGPs), que

podem mudar à medida que as células amadurecem e se diferenciam (KEEGSTRA, 2010).

As paredes celulares secundárias, que são desenvolvidas a partir da parede primária, são caracterizadas pela adição de uma segunda parede celular, situada internamente a primária, que forma uma estrutura circundante, espessa e enrijecida por impregnação de lignina, que interrompe a expansão e o crescimento celular. A natureza dos constituintes dessa parede depende do tipo de célula e do tecido a qual ela se encontra, entretanto, geralmente é encontrada em células diferenciadas as quais necessitam de reforço estrutural para gerar resistência contra a compressão e rigidez (FRY, 2004; PÉREZ; MAZEAU, 2005; CAFFALL; MOHNEN, 2009; KEEGSTRA, 2010; GILBERT, 2010).

### 4.3.1 Polissacarídeos e glicoconjugados presentes na parede celular das plantas

#### 4.3.1.1 Celuloses e hemiceluloses

A celulose é o componente mais característico encontrado em todas as paredes celulares de plantas. Sua estrutura básica, como pode ser observado na FIGURA 2 A, consiste de cadeias de monômeros de glucose (Glc*p*) na configuração D, com ligações glicosídicas do tipo β-(1→4) que formam polímeros lineares e insolúveis em água. As cadeias lineares interagem entre si, através de interações de hidrogênio, formando microfibrilas longas e cristalinas (FIGURA 2 B) (FRY, 2003; PÉREZ; MAZEAU, 2005; WYMAN *et al*., 2005; KEEGSTRA, 2010; GILBERT, 2010; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; OCHOA-VILLARREAL *et al.,* 2012).

Essa estrutura é resistente a grandes trações e representam cerca de 20% a 30% da matéria seca da parede celular primária podendo ocupar até 15% desta região em volume, enquanto que, em paredes celulares secundárias, pode atingir de 40 a 90% do peso da biomassa dessa estrutura (PÉREZ; MAZEAU, 2005; OCHOA-VILLARREAL *et al.,* 2012). As moléculas de celulose estão extremamente organizadas, sendo assim, consideradas como os polímeros mais ordenados das paredes celulares. Essa característica é a que, aparentemente, contribui com a sua funcionalidade, que além de proporcionar força, ajuda a controlar o crescimento da célula (PÉREZ; MAZEAU, 2005; THOMAS *et al*., 2013).

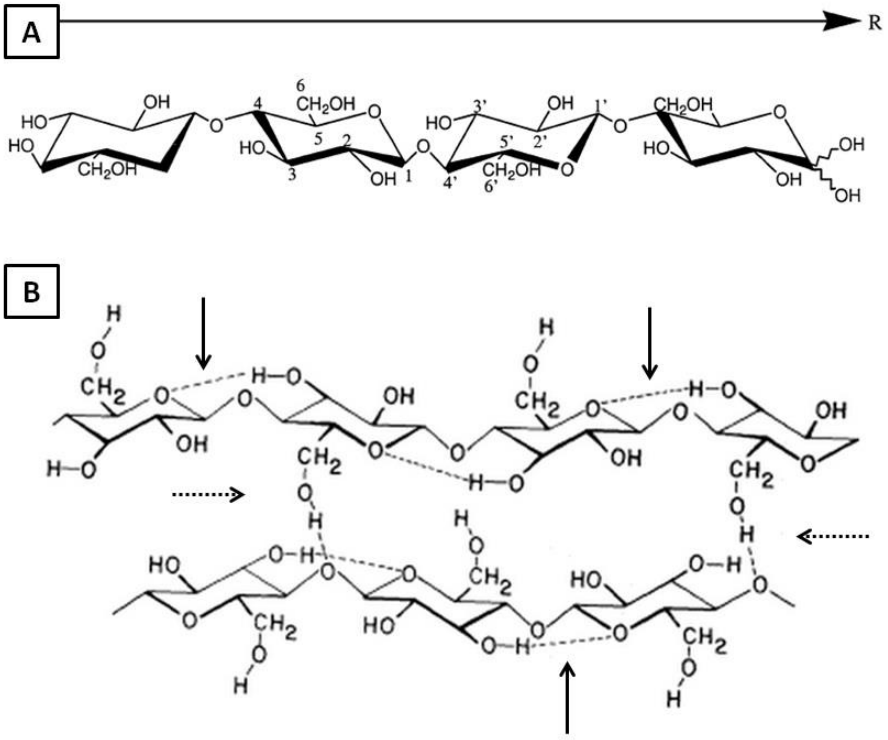



**FIGURA 2 -** MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES NAS MOLÉCULAS DE CELULOSE
FONTE: Adaptado de PÉREZ; MAZEAU (2005); SMITH (1977).
NOTA: **A** - Modelo esquemático da cadeia primária de celulose, formada pelo homopolímero linear contendo ligações glicosídicas β-(1→4) de monômeros de D-Glc*p*. **B** - Modelo esquemático da estrutura de microfibrilas de celulose. **Seta pontilhada** - Interações de hidrogênio intermolecular; **Seta contínua** - Interações de hidrogênio intramolecular.

As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polímeros que apresentam uma cadeia principal composta por unidades de glucose (D-Glc*p*), manose (D-Man*p*) ou xilose (D-Xyl*p*) β-(1→4) ligadas em configuração equatorial no C1 e C4, como demonstrado na FIGURA 3. Nestes polissacarídeos esta configuração gera semelhança estrutural significativa entre os polímeros, desta forma a classificação é de acordo com o monossacarídeo majoritário presente na cadeia principal. Os principais constituintes deste grupo são: as xilanas, arabinoxilanas, galactomananas, glucomananas, xiloglucanas, mananas e as β-(1→3,1→4) glucanas (Família Poales) (PÉREZ; MAZEAU, 2005; WYMAN *et al.,* 2005; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

A função mais conhecida destes polissacarídeos na plantas é a estrutural. As hemiceluloses estão presentes no meio extracelular, conectadas, através de interações moleculares, com as microfibrilas de celulose formando a matriz da parede celular. Entretanto, estes polímeros, ainda podem atuar como moléculas

sinalizadoras, ou seus precursores, bem como na forma de substâncias de reserva. (SMITH, 1977; PÉREZ; MAZEAU, 2005; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

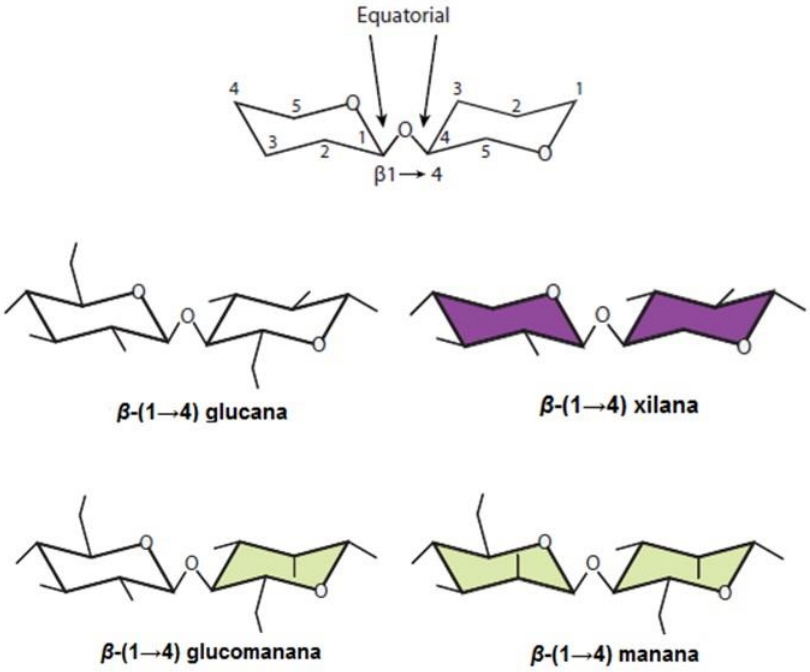



**FIGURA 3** - MODELO PROPOSTO PARA DISSACARÍDEOS DE HEMICELULOSE
FONTE: Adaptado de SCHELLER; ULVSKOV (2010).
NOTA: Configuração equatorial entre o C-1 e C-4.

4.3.1.3 Pectinas

As pectinas compreendem o terceiro grupo dos polissacarídeos da parede celular das plantas. É particularmente abundante nas paredes celulares primárias de magnoliopsidas, liliopsidas não gramíneas e em alguns frutos, como nos cítricos e na maça. Também estão presentes em paredes celulares secundárias e em paredes primárias de gramíneas, porém nestes, em quantidades relativamente baixas (CAFFALL; MOHNEN, 2009; MICHELI, 2001; ATMODJO *et al*., 2013).

Sabe-se que em plantas, além da sua função estrutural na parede celular, colaboram em outras funções biológicas importantes, como: no crescimento, desenvolvimento e morfogênese das células, na defesa, na adesão célula-célula, na sinalização e expansão celular, na porosidade da parede celular e no auxílio de ligações de íons. Também podem atuar como reguladores de enzimas de modulação, no crescimento do tubo polínico, na hidratação das sementes e no

desenvolvimento e queda das folhas e frutos (WYMAN *et al*., 2005; CAFFALL; MOHNEN, 2009; OCHOA-VILLARREAL *et al.,* 2012; ATMODJO *et al*., 2013).

Acredita-se que a rede de pectinas presentes na parede celular primária é formada a partir de três polímeros pécticos, as homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e do tipo II (RG-II), como observado na FIGURA 4. Porém, outros polissacarídeos pécticos, como as xilogalacturonanas, apiogalacturonanas, galacturonogalacturonanas, galactogalacturonanas e arabinogalacturonanas também foram purificados a partir de materiais de parede celular vegetal (PÉREZ; MAZEAU; PENHOAT, 2000; PAULSEN; BARSETT, 2005; OVODOV, 2009; CAFFALL; MOHNEN, 2009; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; YAPO, 2011; ATMODJO *et al*., 2013).

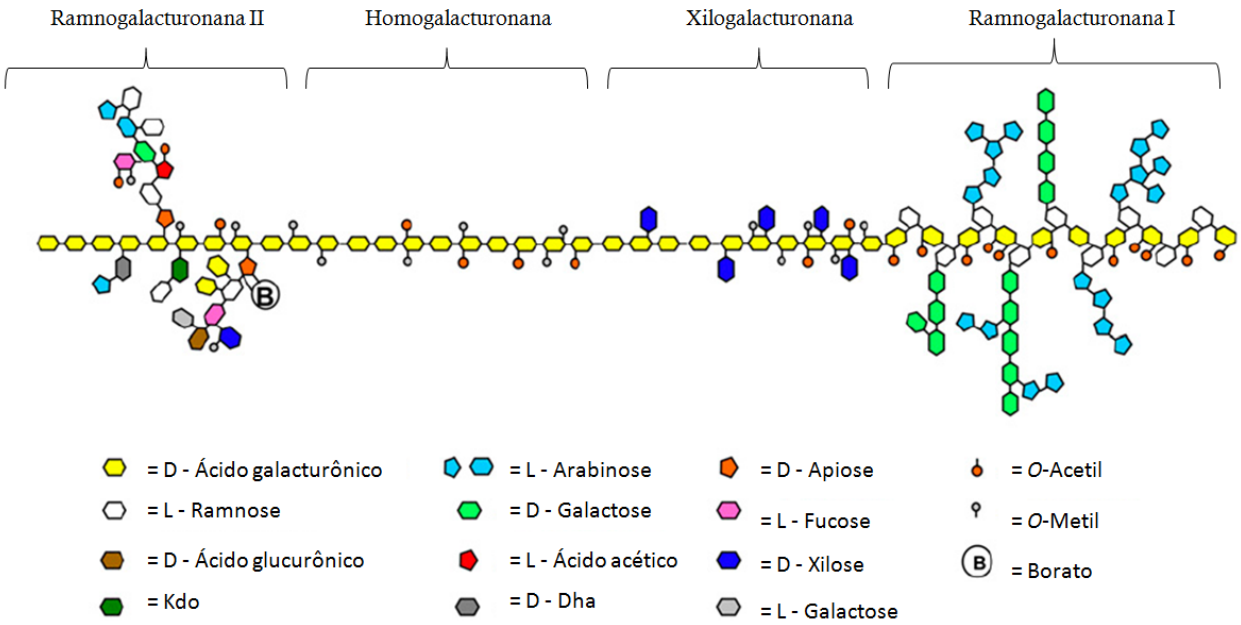



**FIGURA 4** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM PECTINAS
FONTE: Adaptado de HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER (2010).
NOTA: **Kdo** - Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico; **Dha** - Ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico.

4.3.1.3.1 Elementos estruturais que podem estar presentes nas pectinas

a) Homogalacturonanas

As homogalacturonanas (HG) são compostas por um homopolímero linear de unidades de D-Gal*p*A α-(1→4) ligadas. Esta estrutura muitas vezes também é referida como *smooth regions* dos complexos pécticos. Alguns grupamentos

carboxílicos podem estar metil esterificados na posição *O*-6 e, dependendo da planta, os grupamentos acetil estão esterificados nas posições *O*-2 e *O*-3 (FIGURA 5) (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; CAFFALL; MOHNEN, 2009; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; ATMODJO *et al*., 2013). A sua cadeia principal, liga-se covalentemente a porções de RG-I e RG-II, e acredita-se que também possa se ligar a hemiceluloses, em especial a xiloglucanas (XG). (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

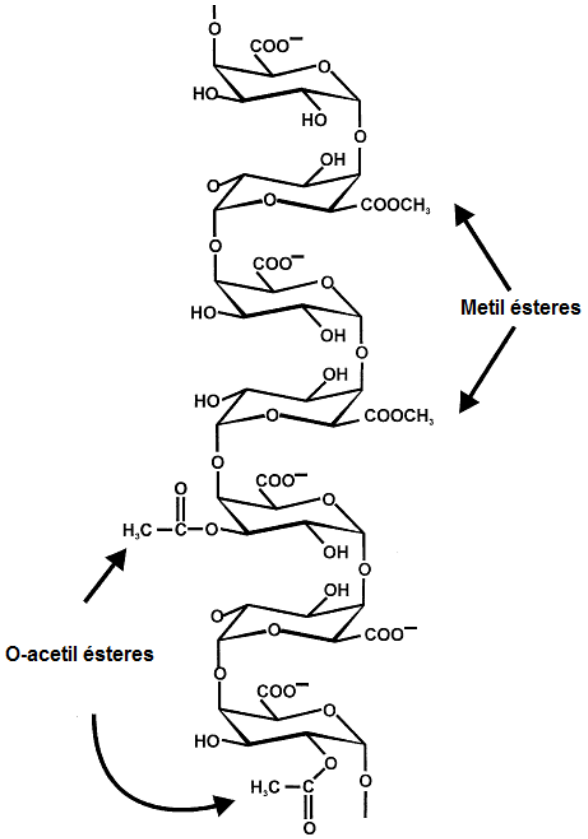



**FIGURA 5 -** MODELO PROPOSTO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE UMA HOMOGALACTURONANA
FONTE: Adaptado de RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN (2001).
NOTA: Unidades de Gal*p*A unidas por ligações α-(1→4) em um polímero linear.
**Grupamentos metil** - Estão esterificados em grupamentos carboxílicos; **Grupamentos acetil** - Estão *O*-ligados nas posições 2 e 3.

b) Apiogalacturonanas e xilogalacturonanas

As apiogalacturonanas são encontradas em paredes de plantas aquáticas, como nas famílias Lemnaceae e Zosteraceae. São caracterizadas pela presença de unidades de β-D-Api*f* ligados nas posições *O*-2 ou *O*-3 de unidades de Gal*p*A da

HG, sua estrutura está ilustrada na FIGURA 6 A (CAFFALL; MOHNEN, 2009; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; ATMODJO *et al*., 2013).

As xilogalacturonanas (XGA) estão presentes em abundância nos tecidos reprodutivos e nas folhas em *Arabidopsis* (HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010). Estruturalmente é caracterizada pela presença de unidades de D-Xyl*p* β-(1→4) ligadas na posição *O*-3 de unidades de Gal*p*A da cadeia principal de HG (FIGURA 6 B) (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; CAFFALL; MOHNEN, 2009).

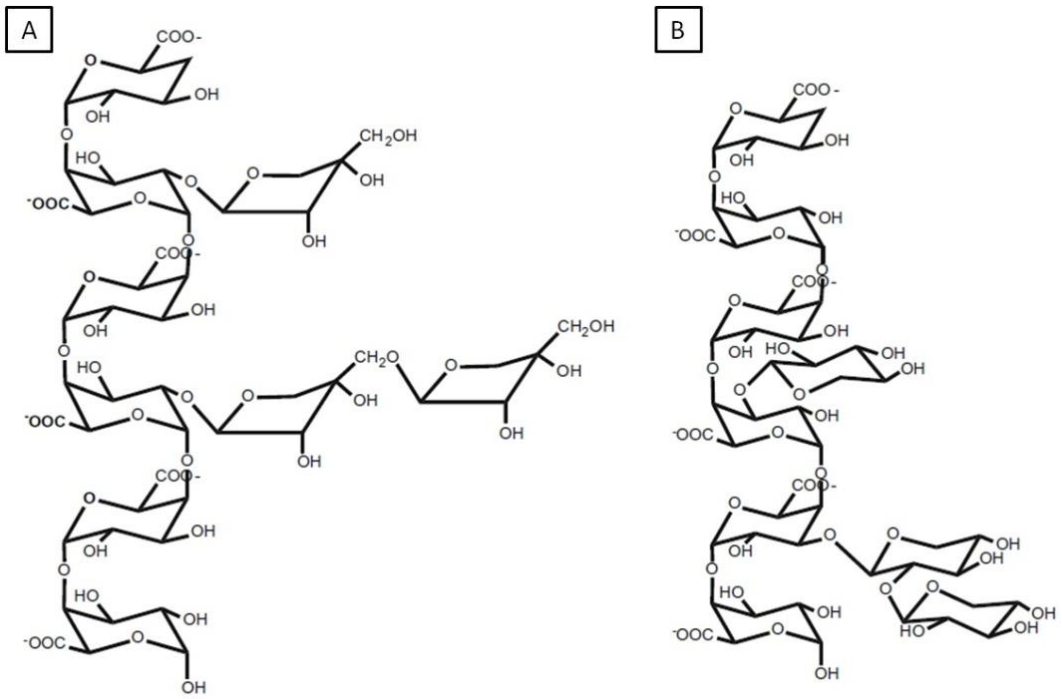



**FIGURA 6** - MODELO PROPOSTO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE APIOGALACTURONANAS E XILOGALACTURONANAS
FONTE: Adaptado de CAFFALL; MOHNEN (2009).
NOTA: **A** - Apiogalacturonanas: unidades de D-Api*f* β-(1→2) ligadas a unidades de Gal*p*A da cadeia linear de HG; **B** - Xilogalacturonanas: Unidades de D-Xyl*p* β-(1→4) ligadas a unidades de Gal*p*A da cadeia linear de HG.

c) Ramnogalacturonanas do tipo I

As ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) consistem em cerca de 20% a 35% das pectinas. Essas moléculas são caracterizadas por apresentarem uma cadeia principal contendo unidades repetitivas de Gal*p*A e Rha*p*: [→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→]$_{n,}$ como observado na FIGURA 7 (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; ATMODJO *et al.,* 2013).

As unidades de Gal*p*A são altamente acetiladas em *O*-2 ou *O*-3 enquanto as unidades de Rha*p* apresentam substituições, em cerca de 20 a 80%, das suas posições *O*-4 e, ocasionalmente, na posição *O*-3, por oligo e polissacarídeos lineares ou ramificados. Há relatos, que unidades de Rha*p* ainda possam apresentar grupamentos acetil (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; PAULSEN; BARSETT, 2005; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; ATMODJO *et al.,* 2013).

Até agora foram identificadas 40 estruturas diferentes de cadeias laterais *O*-4 ligadas nas unidades de Rha*p* e as predominantes incluem: L-Arabinanas α-(1→5) ligadas, que podem estar ramificadas com arabinose ou arabinanas nas posições *O*-2 e *O*-3; D-Galactanas β-(1→4) ligadas, as quais podem estar ramificadas com L-Ara*f* ou arabinana na posição *O*-3 e D-Galactanas β-(1→3) ligadas com ramificações em *O*-6 contendo galactanas ou arabinogalactanas e essas regiões ramificadas, compreendem, a *hairy region* dos complexos pécticos. Algumas RG-I ainda podem incorporar unidades como o β-D-Xyl*p*, α-L-Fuc*p*, α-D-Fuc*p*, 3-*O*-metil-β-D-Glc*p*A, 4-*O*-metil-β-D-Glc*p*A como unidades terminais das cadeias laterais (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; YAPO, 2011; ATMODJO *et al.,* 2013).

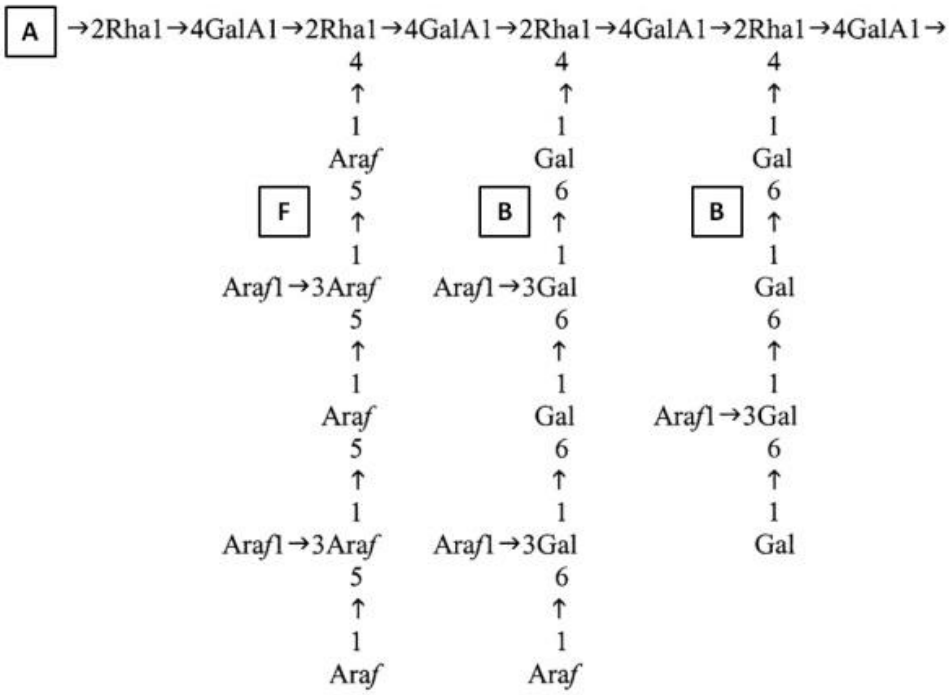



**FIGURA 7** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA RAMNOGALACTURONANA DO TIPO I
FONTE: Adaptado de RIDLEY; O'NEILL; MOHEN (2001); PAULSEN; BARSETT (2005).
NOTA: **A** - Cadeia principal composta por unidades repetidas do dissacarídeo [→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α–L-Rha*p*-(1→]$_n$ contendo ramificações, **B** - Arabingalactana β-(1→4) ligados a unidades de α-L-Rha*p*; **C** - Galactana β-(→4) e β-(4→6) ligados a unidades de α-L-Rha*p*; **D**- Unidade de α-L-Ara*f*; **E**- Unidade de β-D-Glc*p*A; **F** - Arabinana α-(3) e α-(3→5); **G** - Unidade de β-D-Gal*p*.

d) Ramnogalacturonanas do tipo II

As ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) constituem cerca de 10% das pectinas. É o polissacarídeo péctico mais complexo, porém o que apresenta a estrutura mais conservada. A característica mais marcante desta molécula é possuir açúcares raros. Dentro desse grupo encontram-se: 2-*O*-metil-fucose, 2-*O*-metil-xilose, Api*f*, ácido acérico (3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose), Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico) e Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heotulosárico) e as mais de 20 ligações glicosídicas, as quais geram funções críticas no crescimento e desenvolvimento das plantas (PÉREZ; MAZEAU; PENHOAT, 2000; PAULSEN; BARSETT, 2005; ATMODJO *et al*., 2013).

A estrutura primária das RG-II consiste de D-Gal*p*A α-(1→4) ligados formando uma cadeia principal homogênea e linear. Nessa cadeia, existe a presença de quatro cadeiras laterais diferentes, designadas de A, B, C e D (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; ATMODJO *et al*., 2013). As cadeias A (octassacarídeo) e B (nanossacarídeo), na maioria das plantas, estão *O*-2 ligadas a resíduos de Gal*p*A na cadeia de HG, através de resíduos de β-D-Api*f*, enquanto que as cadeias C e D (ambos dissacarídeos) são ligadas no esqueleto de HG na posição *O*-3, como pode ser observado na FIGURA 8 (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; PAULSEN; BARSETT, 2005 HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; ATMODJO *et al*., 2013).

RG-II é o único polissacarídeo, isolado de uma fonte biológica, que apresenta o boro. Este elemento químico está na forma diéster de borato, a qual medeia ligação entre as subunidades de RG-II para formar uma estrutura dímera (dRG-II), que é a forma predominante desta molécula. Esta ligação é formada entre *OH*-2 e *OH*-3 das unidades de Api*f* em cada subunidade monomérica de RG-II (O'NEILL *et al.,* 1996; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; YAPO, 2011).

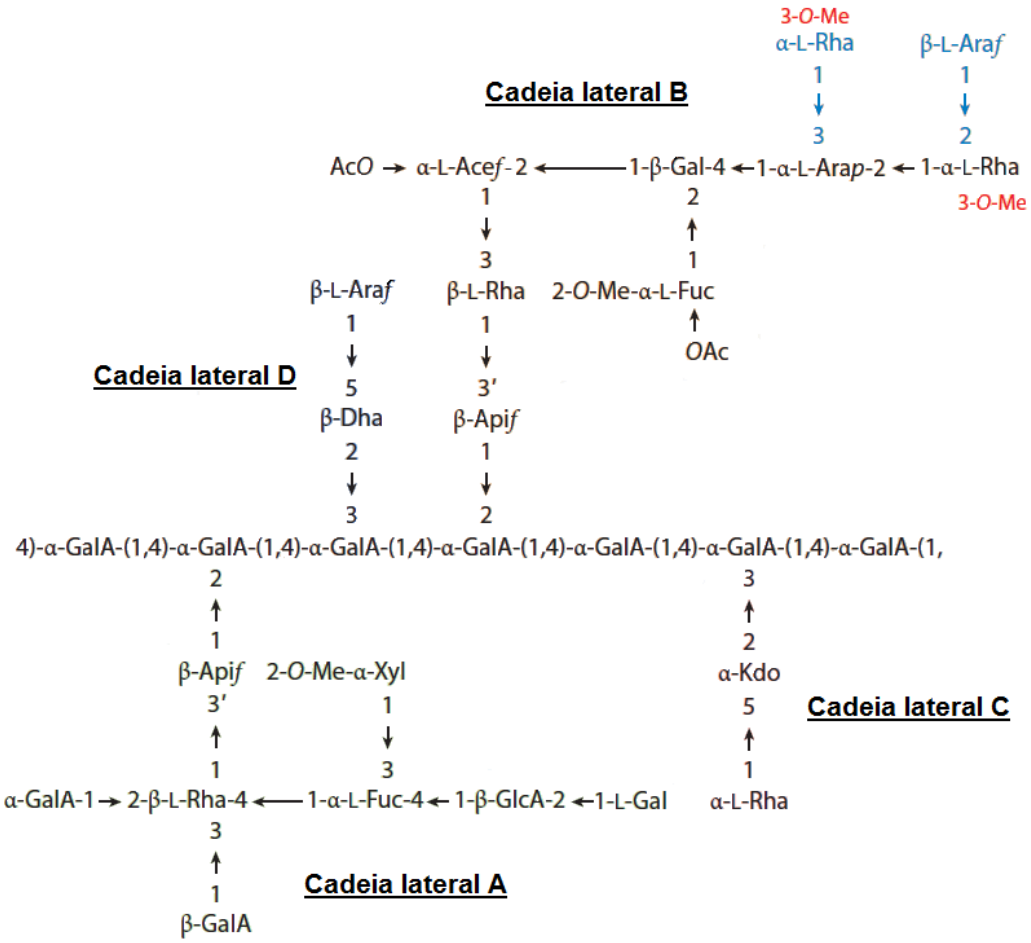



**FIGURA 8** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA RAMNOGALACTURONANA DO TIPO II
FONTE: Adaptado de ATMODJO *et al*. (2013)
NOTA: **Vermelho** - Estruturas presentes em RG-II de algumas espécies de plantas que não produzem flores (Divisão Pteridophyta e Lycophyta); **Azul** - Estruturas presentes no gênero *Arabidopsis* ou espécies relacionadas.

e) Arabinanas

A arabinana é um homopolissacarídeo composto basicamente por L-Ara*f* unidas por ligações glicosídicas α-(1→5) e, dependendo da fonte, pode estar presente na forma linear ou ramificada. Seus pontos de ramificações, principalmente, envolvem a posição *O*-3 (FIGURA 9), porém há relatos da existência de ligações na posição *O*-2, entretanto, em menor frequência (PÉREZ; MAZEAU; PENHOAT, 2000; PAULSEN; BARSETT, 2005).

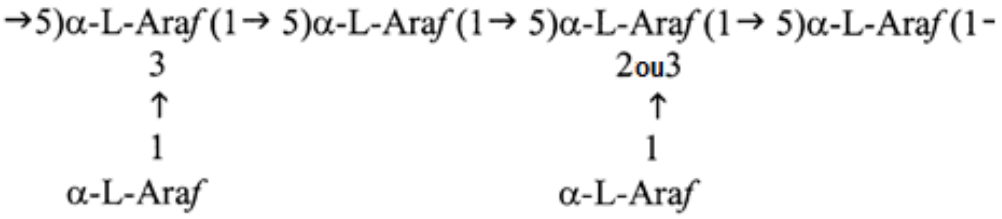



**FIGURA 9** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA ARABINANA
FONTE: Adaptado de PAULSEN; BARSETT (2005).

f) Arabinogalactanas tipo I e II

As arabinogalactanas geralmente são classificadas em: arabino-4-galactanas (Tipo I ou AG-I) e arabino-3, 6-galactanas (Tipo II ou AG-II).

As AG-I podem ser encontradas na parede celular na forma livre ou como constituinte do complexo péctico de RG-I. São compostas por uma cadeia principal linear de galactanas β-(1→4) ligadas. Cerca de 20 a 40% das unidades de D-Gal*p* apresentam substituições de cadeias curtas, na posição *O*-3, de arabinanas, L-Ara*f* α-(1→5), como observado na FIGURA 10 (PÉREZ; MAZEAU; PENHOAT, 2000; PAULSEN; BARSETT, 2005).

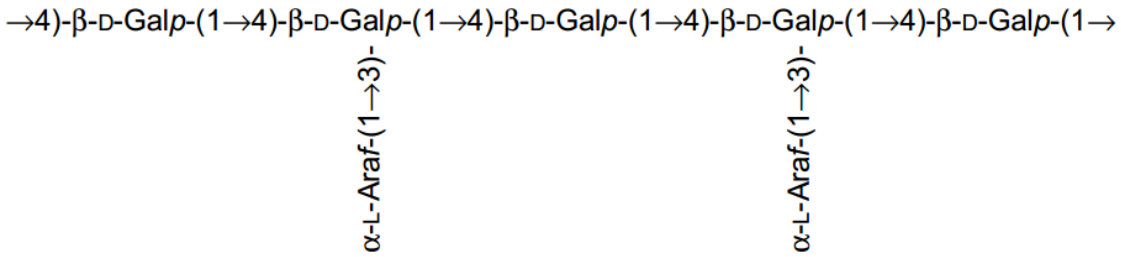



**FIGURA 10** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA ARABINOGALACTANA DO TIPO I
FONTE: CARPITA; GIBEAUT (1993).

As AG-II são as estruturas mais complexas encontradas na cadeia lateral de RG-I (FIGURA 11). Essas moléculas apresentam cadeia principal de β-D-Gal*p* unidas por ligações (1→3), com ramificações curtas, de β-D-Gal*p* (1→6) ligadas, que são terminadas por unidades de α-L-Ara*f* ligadas de forma (1→3) e/ou (1→5) (PÉREZ; MAZEAU; PENHOAT, 2000; PAULSEN; BARSETT, 2005).

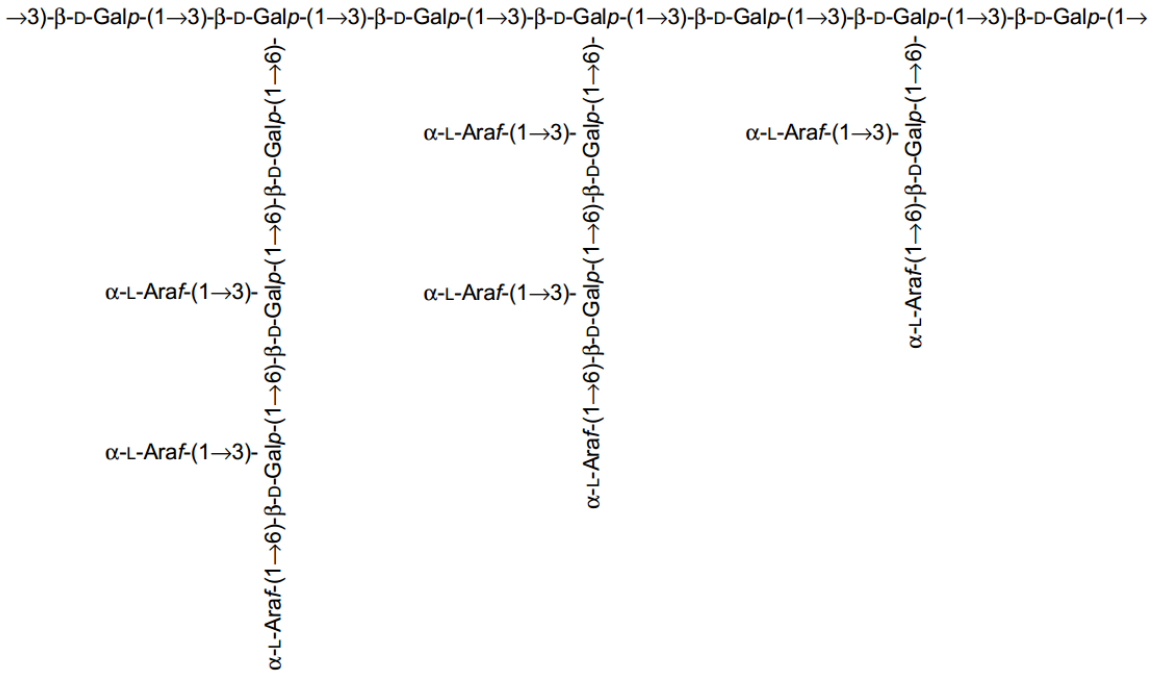



**FIGURA 11** - MODELO PROPOSTO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM UMA ARABINOGALACTANA DO TIPO II
FONTE: CARPITA; GIBEAUT (1993).

4.3.1.4 Arabinogalactanas-proteína

A arabinogalactana-proteina (AGP) compreende uma família de glicoproteínas vegetais complexas. Estas moléculas são expressas em todo o reino vegetal e acredita-se, estar relacionada na proliferação e extensão celular, na apoptose, na germinação, na embriogênese somática, ou seja, no crescimento e desenvolvimento da planta. Também são encontradas associadas à membrana plasmática, à parede celular, no espaço extracelular entre as paredes celulares (apoplásto) e em secreções como as gomas e exsudados, sendo nestes últimos, a AGP o principal componente (VAN HOLST; CLARKE, 1985; SHOWALTER, 2001; LEE *et al*., 2005; ELLIS *et al*., 2010; KITAZAWA *et al*., 2013).

A sua porção de carboidrato, está organizada em unidades polissacarídicas, que variam de 30 a 150 unidades monossacarídicas. Estas unidades estão ligadas em múltiplos locais no *core* proteico e são constituídas, principalmente, de Gal*p* e Ara*f*. As unidades de β-D-Gal*p* estão ligadas entre si, para formar uma cadeia principal, com ligações do tipo β-(1→3). As ramificações, presentes na posição *O*-6,

podem ser constituídas de cadeias por unidades de β-D-Gal*p*, contendo, geralmente, uma unidade terminal de α-L-Ara*f*, ou seja, uma arabinogalactana do tipo II. A porção terminal, algumas vezes, pode ser constituída de outros monossacarídeos, menos abundantes, como a L-Rha, D-Xyl, D-Glc, L-Fuc, D-GlcN, D-GlcA e D-GalA. As porções de carboidratos estão *O*-ligadas aos resíduos de hidroxiprolina e, possivelmente, também nos resíduos de serina e treonina. Existem relatos da existência de AGPs contendo polissacarídeos *N*-ligados (SHOWALTER, 2001; LEE *et al*., 2005; KITAZAWA *et al*., 2013).

AGPs são amplamente remodeladas por modificações pós-traducionais, como por exemplo, a hidroxilação e glicosilação dos resíduos prolina (Pro), no entanto, pouco se sabe sobre o processamento posterior das AGPs (SHOWALTER, 2001), o modelo estrutural hipotético da molécula de AGP, está ilustrado na FIGURA 12.

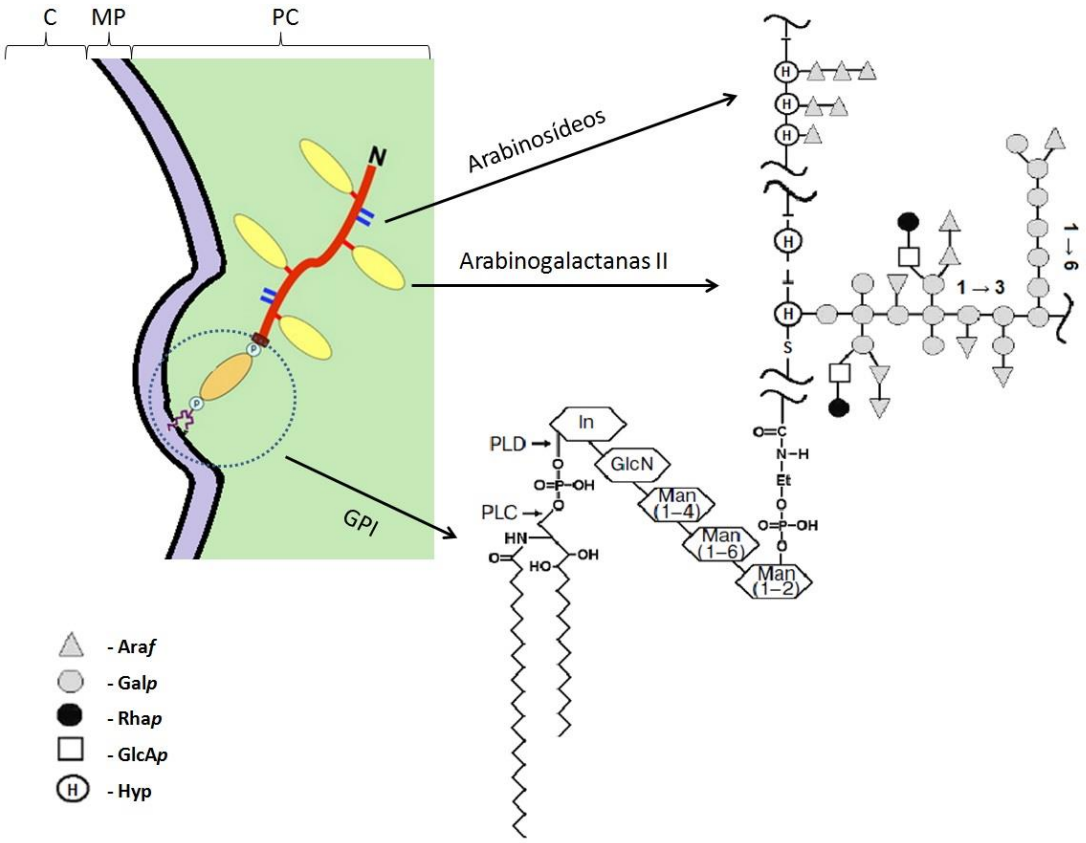



**FIGURA 12** - MODELO HIPOTÉTICO DE UMA MOLÉCULA DE AGP
FONTE: Adaptado de RUMYANTSEVA (2005); ELLIS *et al.* (2010).
NOTA: **Circulo pontilhado** - Detalhe da âncora lipídica glicosilfosfotidilinositol (GPI), constituída pela porção carboxi-terminal do polipeptídio de AGP ligada à etanolamina fosfato (oligossacarídeo ligador) e a um lipídeo inserido na membrana plasmática. **C** - citoplasma; **MP** - membrana plasmática; **PC** - Parece celular; **PLC** - Sítio de clivagem específico para fosfolipase (C); **PLD** - Sítio específico de clivagem para fosfolipase D.

## 4.4 *Abelmoschus esculentus* L. (Moench)

O *Abelmoschus esculentus* L. (Moench) é conhecido por diferentes nomes ao redor do mundo, tais como: *abelmosco, bâmia, benda, bendé, bendó, calalu, gobo, gombô*, *guingombô*, *kingombó*, quiabeiro, quiabeiro-chifre-de-veado, quiabeiro-comum, *ochro, okoro, kopi arab, bamieh*, *bendi*, *quimbombô, quingobó e quingombó, gumbo, lady finger*, *gombo*, *okra, quimbombó, quimgombó, bendi, bhindi, ockro, vendai*, *huangshu-k'uei*, além da sua denominação botânica antiga - *Hibiscus esculentus* L. (LIMA, 2007; BENCHASRI, 2012; JAIN *et al.,* 2012).

É uma planta de origem africana onde ainda é encontrada crescendo na forma selvagem ao longo do rio Nilo, no Egito, e na Etiópia. Segundo Ames e Macleod (1990), a utilização do quiabo remota desde 1219 a.C. e acredita-se que foi levada ao novo mundo em meados de 1700 e chegou ao Brasil através dos escravos (EJECH *et al.,* 1997; JAIN *et al.,* 2012). Nos dias atuais, apresentam grande importância comercial e devido a isto é cultivada em praticamente todas as áreas tropicais e subtropicais ao redor do mundo (FIGURA 13) (OWOLARAFE; SHOTONDE, 2004; LIMA, 2007; SENGKHARPARN *et al.,* 2009a; BECHASRI, 2012).

**FIGURA 13** - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *Abelmoschus*
FONTE: Adaptado de Charrier (1984).

### 4.4.1 Características gerais

O quiabo pertence à classe das Magnoliopsida, e à família Malvaceae (LENGSFELD *et al*., 2004; ATAWODI *et al.,* 2009; JAIN *et al.,* 2012) (TABELA 1). Seu crescimento é anual, podendo chegar até três metros de altura. Apresenta caule semi-lenhoso, robusto, ereto e variável em relação às ramificações. As folhas são

grandes, lobadas, alternadas e apresentam cerca de 20 a 30 cm de comprimento. As suas flores, FIGURA 14 A e B, são hermafroditas e apresentam coloração amarela com a região central variando de vermelho a rosa. Geralmente, apresentam localização e surgem entre os meses de julho a setembro. Os frutos longos, pilosos e esverdeados, FIGURA 14 C e D, são do tipo cápsula e possuem seis câmaras de textura fibrosa rica em sementes oleaginosas. Nascem tanto na haste principal como nas laterais. (VAN DEN BROEK *et al.,* 2002; LENGSFELD *et al.,* 2004; BIOLOGY OF OKRA, 2009; BENCHASRI, 2012; JAIN *et al.,* 2012). Apresenta preferência por regiões ricamente iluminadas, quentes, (25 ºC ou mais), úmidas e férteis, porém tolera pequenas adversidades ambientais (VAN DEN BROEK *et al.,* 2002; JAIN *et al.,* 2012).

**TABELA 1** - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DO *Abelmoschus esculentus* L. Moench

| | |
|---|---|
| **Reino** | **Plantae** |
| **Divisão** | **Magnoliophyta** |
| **Classe** | **Magnoliopsida** |
| **Ordem** | **Malvales** |
| **Família** | **Malvaceae** |
| **Gênero** | ***Abelmoschus*** |
| **Espécie** | ***Abelmoschus esculentus*** |

FONTE: Adaptado de *International Okra Workshop held at National Bureau of Plant Genetic Resources* (1991)

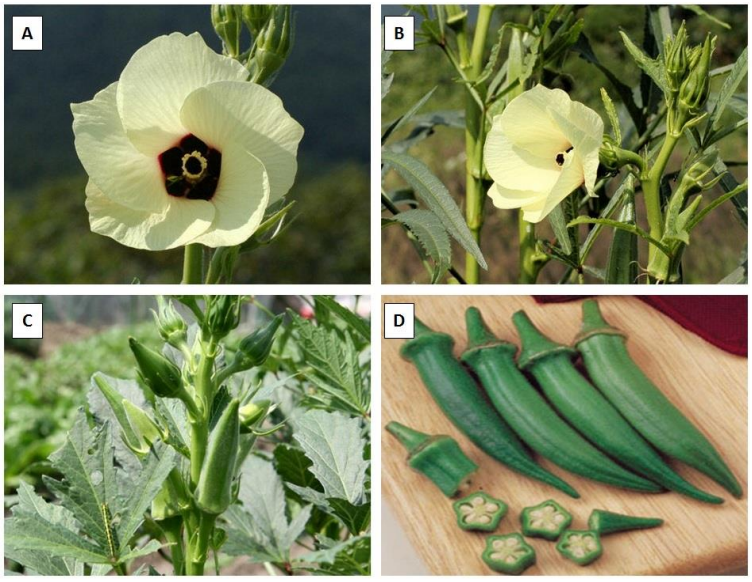



**FIGURA 14** - DETALHES DAS FLORES E FRUTOS DO *Abelmoschus esculentus* L. Moench
FONTE:http://www.botanic.jp/plants-aa/okra.htm; http://evergreenfarmslib.com/Productsandservices.htm
NOTA**: A** e **B** - Flor; **C -** Detalhe da planta; **D** - Frutos.

Seus frutos são uma rica fonte de carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais (TABELA 2). Desta forma, são amplamente consumidos em regiões em desenvolvimento, onde seus habitantes os cultivam em seus quintais. Além desta utilidade, a planta ainda pode ser usada na confecção de cordas e de papel (EJECHI; OJEATA; OYELEKE, 1997; OWOLARAFE; SHOTONDE, 2004; VWIOKO; OSAWARU; ERUGUN, 2008; KHOMSUG *et al.,* 2010).

**TABELA 2** - INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS ENCONTRADOS NOS FRUTOS, FOLHAS E SEMENTES DE *A. esculentus*

| | **Frutos[1,2]** | **Folhas[1,2]** | **Sementes [3]** |
|---|---|---|---|
| **Energia** | 36 kcal | 56 kcal | - |
| **Água** | 88,6 g | 81,50 g | - |
| **Proteína** | 2,10 g | 4,40 g | 20-30% |
| **Carboidrato** | 8,20 g | 0,60 g | 6-9% |
| **Ácidos graxos** | 0,20 g | 11,30 g | 16-18% |
| **Fibra** | 1,70 g | 2,10 g | - |
| **Cálcio** | 84 mg | 532 mg | 135mg |
| **Fósforo** | 90 mg | 70 mg | - |
| **Ferro** | 1,20 mg | 0,7 mg | < 5 mg |
| **Magnésio** | - | - | 335 mg |
| **Manganês** | - | - | < 5 mg |
| **Zinco** | - | - | < 5 mg |
| ***β*-caroteno** | 185 µg | 385 µg | - |
| **Riboflavina** | 0,08 mg | 2,8 mg | - |
| **Tiamina** | 0,04 mg | 0, 25 mg | - |
| **Niacina** | 0,6 mg | 0, 20 mg | - |
| **Ácido ascórbico** | 47 mg | 59 mg | - |

FONTE: O autor; [1] - BENCHASRI (2012); [2] - VWIOKO; OSAWARU; ERUGUN (2008); [3] - SAVELLO; MARTIN; HILL (1980)
NOTA: Valores obtidos em 100 g de material; - não mencionado.

### 4.4.2 Utilização medicinal

O *A. esculentus* é largamente utilizada na medicina tradicional. Seus frutos são ricos em polissacarídeos e compostos fenólicos, aos quais são relatadas diversas atividades biológicas (FAN *et al.,* 2013). Sua primeira descrição foi no ano de 1216, pelo botânico Sevilhano Abul-Abbas-elNebate, que o recomendava como um excelente emoliente (ALONSO, 2007).

As partes utilizadas como medicinais são as sementes e o seu óleo extraído, os frutos imaturos, as folhas e flores (ALONSO, 2007). Os frutos imaturos contêm

grande quantidade de mucilagem, que é uma substância rica em polissacarídeos e pode ser utilizadas como expansor plasmático e agente de circulação intravenoso (TOMODA *et al.,* 1980; VWIOKO; OSAWARU; ERUGUN, 2008; BENCHASRI, 2012; JAIN *et al.,* 2012). Ainda é utilizado como agente diurético, no tratamento de doenças dentárias, como antiulcerogênico e gastoprotetor, sendo, que nas duas últimas citadas, a mucilagem é o elemento terapêutico (NDJOUENKEU; AKINGBALA; OGUNTIMEIN, 1997; LENGSFELD *et al.,* 2004; SHEU; LAI, 2012).

Na medicina popular a decocção dos frutos imaturos é utilizada como diurético e emoliente (JAIN *et al*., 2012). Na medicina tradicional turca, 100g dos frutos frescos são ingeridos durante 10 dias para o tratamento de desordem gástricas (úlcera e dor) (GÜRBÜZ *et al.,* 2003) o que sugere que os frutos possam possuir propriedades antioxidantes (SHUI; PENG, 2004; ATAWODI *et al*., 2009). A sua fibra, consumida na alimentação, auxilia na estabilização dos níveis de glucose, colesterol e triacilglicerídeos do soro, através do controle da taxa em que estas substâncias são absorvidas a partir do trato intestinal (SABITHA *et al.,* 2011; URAKU *et al.,* 2011). Na África, esta espécie é utilizada na dieta terapêutica, para o tratamento de dores menstruais e para a hipertensão (URAKU *et al*. 2011) e a infusão das raízes é usada no tratamento de sífilis. No Nepal, o suco obtido das raízes é utilizado para o tratamento de cortes, feridas e furúnculos e a infusão das sementes torradas apresenta propriedades sudoríferas (JAIN *et al.,* 2012). A TABELA 3 ilustra, resumidamente, algumas das utilizações de *A. esculentus* na medicina tradicional.

**TABELA 3** - *A. esculentus* NA MEDICINA TRADICIONAL

| Parte | Utilização | Referência |
|---|---|---|
| **Frutos** | Expansor plasmático [1],<br>Agente de circulação intravenoso [1],<br>Agente diurético [2],<br>Tratamento de disúria [6],<br>Tratamento de doenças dentárias [2],<br>Agente antiulcerogênico [3,4],<br>Agente gastoprotetor [3,4],<br>Como enxágue ocular [5],<br>Tratamento de furúnculos e gonorreia [6] | [1] - TOMODA *et al*., 1980<br>[2] - NDJOUENKEU; AKINGBALA; OGUNTIMEIN, 1997<br>[3] - GÜRBÜZ *et al.,* 2003<br>[4] – ATAWODI *et al*., 2009<br>[5] - ALONSO, 2007<br>[6] - JAIN *et al.,* 2012 |
| **Folhas** | Cataplasma emoliente [1, 3] ,<br>Tratamento de bronquite e problemas pulmonares em geral [2],<br>Tratamento de disúria [3, 4, 5],<br>Tratamento de escorbuto [4] | [1] – OWOLARAFE; SHOTONDE, 2004<br>[2] - SILVA, 2006<br>[3] - JAIN *et al*., 2012<br>[4] - VWIOKO; OSAWARU; ERUOGUN, 2008<br>[5] - VAN DEN BROEK *et al.,* 2002 |
| **Raízes** | Demulcente[1],<br>Tratamento de sífilis, cortes e furúnculos[1] | [1] - JAIN *et al*., 2012 |
| **Semente** | Estimulante estomacal [1],<br>Agente antiespasmódico [3],<br>Refrescante bucal [2],<br>Tratamento de febre [2],<br>Tratamento de gastrite [2],<br>Agente sedativo [2],<br>Possui propriedades sudoríferas [3]<br>Agente anti-hiperlipidémico e antidiabético [4],<br>Tratamento de fadiga pulmonar [5] | [1] - SILVA, 2006<br>[2] - ALONSO, 2007<br>[3] - JAIN *et al*., 2012<br>[4] - FAN *et al*., 2013<br>[5] - MORAIS *et al*., 2005 |

Fonte: O autor.

### 4.4.3 Polissacarídeos de *A. esculentus*

A designação mucilagem é amplamente utilizada para denominar substâncias translúcidas e amorfas de várias fontes vegetais, sendo comumente empregado para designar as substâncias viscosas e gelificastes produzidas em grandes quantidades pelo *A. esculentus* (JANI *et al*., 2009)

Diferente das gomas, que são produtos gerados pela partição das paredes celulares das plantas devido a alguma causa patológica e/ou lesional, as mucilagens são geralmente produtos fisiológicos normais do metabolismo das plantas produzidos intracelularmente e/ou sem algum dano a planta (JANI *et al*., 2009). Essas substâncias são encontradas em diferentes partes da planta e são compostos por polímeros homogêneos, ou seja, apresentam apenas um tipo de unidade

monossacarídica, ou por moléculas contendo diferentes unidades monossacarídicas, que geralmente estão combinados com ácidos urônicos (JANI *et al.*, 2009).

A natureza química dos polímeros alteram o comportamento da mucilagem quando em contato com a água. Polissacarídeos lineares tendem a formar soluções viscosas, enquanto que os polímeros altamente ramificados, de mesmo peso molecular, tendem a formar géis e são mais estáveis, devido à impossibilidade de interações extensivas ao longo da cadeia (JANI *et al.,* 2009). Estas mucilagens apresentam potenciais aplicações farmacêuticas, tais como diluentes, aglutinantes, excipientes, desintegrante em comprimidos, espessantes em líquidos orais, coloides protetores em suspensões, agentes de formação de película transdérmica e filmes periodontais, além de gelificantes em base gel para aplicação tópica (ARCHANA *et al.,* 2013).

4.4.3.1 Breve histórico cientifico sobre a caracterização química dos polissacarídeos presentes na mucilagem dos frutos de *A. esculentus*

Whistler e Conrad (1954a,b) fizeram uma das primeiras caracterizações de polissacarídeos presentes na mucilagem de *A. esculentus*. O polímero obtido através das extrações aquosas, de frutos deslipidificados, foi caracterizado como uma molécula ácida, composta D-Gal*p*, L-Rha*p*, D-Gal*p*A. Através da hidrólise ácida parcial, ainda obtiveram D-galactobiose (1→4) ligadas e 2-*O*-(D-Gal*p*A)-L-Rha*p*.

Amin (1956) isolou um polissacarídeos, através de extrações aquosas, composto de 80% de Gal*p*, 10% de Rha*p*, 3% Ara*f* e 6% de Gal*p*A e ainda sugeriu que os componentes principais eram Gal*p* (1→4) ligadas e Rha*p* (1→2) ligadas. Anos mais tarde, Kelkar, Ingle e Bhide (1962) realizaram um estudo onde a hidrólise da mucilagem produziu Glc, GlcN e seis aminoácidos. Kishida e Fukui (1967) encontraram na mucilagem Glc, frutose e 14 aminoácidos, enquanto Woolfe e colaboradores (1977) concluíram que a mucilagem era composta por Gal*p*A, Gal*p*, Rha*p*, Glc*p* na proporção de 1,3:1:0,1:0,1. Tomoda *et al.* em 1980, fizeram estudos utilizando a mucilagem purificada e sugeriram que era composta por uma cadeia contendo unidades repetitivas de (1→4)-*O*-α-(D-Gal*p*A)-(1→2)-*O*-α-L-Rha*p*, e que metades das unidades de L-Rha eram substituídas na posição 4 por 4-*O*-β-D-Gal*p*.

Estudos mais recentes como o de Lengsfeld *et al.* (2004) e com confirmação de Deters e colaboradores (2005), sugerem que o polissacarídeo de *A. esculentus* é composto por unidades de Rhap, GalA*p*, Gal*p*, Glc*p* e GlcA*p*.

Sengkhamparn *et al.* (2009a,b), realizaram extrações sequenciais com as seguintes soluções: tamponante a quente (acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, 70 ºC - HBSS), agente quelante (EDTA 0,05 M, pH 5,2, 70 ºC - CHSS), alcalina diluída (hidróxido de sódio 0,05 M e boroidreto de sódio 20 mM, 0 ºC - DASS) e alcalina concentrada (hidróxido de sódio 6 M e boroidreto de sódio 20 mM, 0 ºC - CASS). Como resultado, os autores demonstraram que a fração HBSS é rica em Gal*p*, Rha*p* e GalA*p*, na proporção de 1,3:1:1,3, ainda apresentando grau de acetilação (DA) de 58% e de metilação (DM) de 24%. Já a fração CHSS apresenta maior quantidade de GalA metil esterificada (DM 63%, DM 48%) e menor proporção de Rha e Gal, indicando a presença de RG-I e HG. A fração DASS foi caracterizada contendo grandes quantidades de Rha*p*, Gal*p*, GalA*p* e Ara*f*, indicando ser uma RG-I contendo cadeias laterais longas de Ara*f* e Gal*p*. E por fim, a última fração obtida, CASS, foi caracterizada como sendo uma xiloglucana, que apresenta oligossacarídeos do tipo XXXG (cadeia principal contendo quatro unidades de Glc com ramificações laterais de Xyl nas posição 1, 2 e 3) e 4-metilglucuronoxilana.

## 4.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS

### 4.5.1 Conceitos básicos sobre o sistema imunológico

Os polissacarídeos provenientes de plantas apresentam inúmeras propriedades terapêuticas e uma delas, em especial, a modulação do sistema imunológico inato, mais especificamente, sobre a função dos macrófagos. Devido a isso, a seguir segue uma breve discussão sobre o sistema imunológico.

O termo imunidade é derivado da palavra latina *immunitas* e, historicamente, significa proteção contra doenças, em especial as infecciosas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Ele compreende uma rede integradas de células, moléculas e órgãos, que atuam na defesa dos vertebrados contra microrganismos infecciosos, pequenas substâncias que são reconhecidas como estranhas e macromoléculas, como as

proteínas e os polissacarídeos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013).

O sistema de defesa é, primeiramente, mediado pelas reações iniciais da imunidade inata, que compreendem mecanismos de defesa celular e bioquímicos, que estão presentes no organismo mesmo antes do ataque do patógeno, desta forma gerando uma resposta rápida, porém não específica. A resposta inflamatória, a fagocitose, a liberação de mediadores químicos e os eventos que envolvem os processos oxidativos constituem algumas das principais etapas da atuação da imunidade inata (NUNES-PINHEIRO *et al*., 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013). Seus principais constituintes estão resumidos na TABELA 4.

**TABELA 4** - PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA IMUNIDADE INATA

| | Defesa | Elemento | Reconhecimento | Resultados |
|---|---|---|---|---|
| Barreiras | Físicas | Camada epitelial da pele e mucosas, Superfície de tecidos glândulares | - | Bloqueio da entrada do patógeno no hospedeiro |
| | Químicas | Substâncias solúveis especializadas com atividade antimicrobiana e pH ácido | - | Bloqueio da entrada do patógeno no hospedeiro |
| Celular | Fagocíticas | Mononucleares (macrófagos e células dendríticas) e polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastócitos) | Estruturas conservadas do patógeno | Destruição do patógeno extracelulares |
| | | | Outros receptores | Produção de substâncias antimicrobianas e de recrutamento celular e molecular |
| | - | Natural Killer | Recrutamento através de moléculas específicas | Reconhecimento e destruição de patógenos, como vírus e células infectadas |
| Químicas | Proteínas circulantes | Frações do sistema complemento | Reconhecimento de moléculas superficiais do patógeno (Via alternativa) | Estimulação da inflamação e destruição do patógeno |
| | | Citocinas, quimiocinas, mediadores da inflamação | Reconhecimento de componentes específicos | Regulação e coordenação da atividade das células da imunidade inata |

FONTE: Adaptado de BEUTLER (2004); ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2008); OWEN; PUNT; STRANFORD (2013)

O sistema imune inato contém uma variedades de mecanismos efetores para elidir ou conter uma infecção, porém, caso ocorra uma falha no mecanismo e/ou o sistema não seja suficiente, a imunidade adaptativa será ativada (NUNES-PINHEIRO *et al.,* 2003; BEUTLER, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O sistema imunológico adaptativo é capaz de discernir e reagir contra uma vasta gama de substâncias exógenas e, para cada antígeno, há uma resposta imunológica específica. Esse tipo de imunidade pode apresentar dois tipos de respostas: imunidade humoral e a imunidade celular, que são mediadas por diferentes componentes do sistema imunológico, porém, apresentando a mesma finalidade, a de eliminar o patógeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Algumas informações adicionais estão disponíveis na TABELA 5.

**TABELA 5** - PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA IMUNIDADE ADAPTATIVA

| Defesa | Elemento | | Resultados |
|---|---|---|---|
| Celular | Linfócitos B | - | Reconhecimento de antígenos extracelulares e Produção de anticorpo |
| | Linfócitos T | T auxiliares | Secreção de citocinas, para proliferação e diferenciação de linfócitos T e outros tipos celulares, como linfócito B, macrófagos e leucócitos |
| | | T citotóxicos | Destruição celular de células infectadas |
| | | T reguladoras | Modulação das respostas imunológicas |
| Humoral | Anticorpos | Imunoglobulinas (ex.: IgA, IgG, IgM, IgE e IgD) | "Neutralização" do patógeno e sua transformação em alvo para destruição por outras células, Ativação do sistema complemento (via clássica) |

FONTE: Adaptado de JANEWAY *et al.* (2002); ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2008)

A imunidade humoral envolve a produção de anticorpos (AC) pelos linfócitos B, através de duas vias: a dependente de linfócitos T e a independente da participação dos linfócitos T. Os AC são capazes de reconhecer os antígenos, neutralizam seus danos e ainda os preparam para serem eliminados. Essa imunidade é o principal mecanismo para a defesa contra micro-organismos extracelulares e suas toxinas (NUNES-PINHEIRO *et al*., 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A imunidade celular é constituída por células especializadas, chamadas de linfócitos T, que apresentam capacidade de destruir patógenos intracelulares através da destruição da célula hospedeira (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

#### 4.5.1.1 Macrófagos

Em circunstâncias normais os monócitos são células circulantes do sangue que apresentam um curto espaço de vida e sofrem apoptose espontânea. Quando ocorre ativação do sistema imunológico fatores de diferenciação, tais como: os fatores estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), de macrófagos (M-CFS) e de fator -1 (CSF-1), são liberados e os monócitos circulantes se diferenciam em macrófagos, células com vida útil mais longa e encontrada em quase todos os órgãos (BEUTLER, 2004; PARIHAR; EUBANK; DOSERFF, 2010; OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013).

Os macrófagos são células fagocíticas mononucleares e, dependendo do tecido a qual residem, apresentam características morfológicas diferentes como, por exemplo, as células achatadas de *Kupffer*, presentes no lúmen dos sinusóides do fígado; osteoclastos, presentes nos ossos, a micróglia, que apresentam formato estrelado e estão presentes no sistema nervoso central (BEUTLER, 2004; PARIHAR; EUBANK; DOSERFF, 2010; OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013).

Estas células estão em constante vigilância, o que é essencial para a reação inicial de uma resposta inflamatória. Sua ativação é acionada pelo reconhecimento de estímulos próprios e externos através de receptores específicos de membrana. O resultado desta estimulação, é a destruição da ameaça exógena, através da fusão da vesícula de internalização do patógeno (fagossomo) com o lisossomos, (PARIHAR; EUBANK; DOSERFF, 2010).

O ato da digestão, forma proteínas patogênicas que se associam às moléculas na superfície celular do complexo de histocompatibilidade principal (MHC - *major histocompatibility complex*), transformando os macrófagos em células apresentadoras de antígenos, ou APC (*antigen-presenting cell*) (OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013). As APCS mielóides são consideradas pontes celulares entre os sistemas imunes inato e adaptativo devido à capacidade do macrófago em capturar um patógeno, no seu local de infecção e o apresentar aos linfócitos T

(CD4+), via MHC classe II, no linfonodo, num processo chamando de apresentação de antígeno. Além das atividades mencionadas, as APCs, em resposta a cada patógeno, ainda secretam proteínas as quais atraem e ativam outras células do sistema imunológico (BEUTLER, 2004; OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013).

Estas células ainda liberam citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6, IL-12 e TNF-α, bem como, espécies reativas de oxigênio (EROS ou ROS), como o ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO•). O NO•, em especial, é produzido pela óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) por ativação dos receptores TLRs em resposta aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS *Pathogen-associated molecular patterns*), especialmente na presença de INF-γ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

#### 4.5.1.2 Citocinas

As citocinas são glicoproteínas de 4 - 15 kDa produzidas por um grande números de tipos celulares, porém, predominantemente por leucócitos. Estão envolvidas em inúmeras funções biológicas e patológicas, incluindo a imunidade inata, adquirida e respostas inflamatórias (BEUTLER, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; FINA; PALLONE, 2008; KHAN, 2008). Porém, a elucidação das atividades fisiológicas de muitas destas moléculas, ainda está em andamento.

Estas moléculas, atuam sobre muitos tipos celulares e tecidos, apresentando, muitas vezes, efeitos múltiplos sobre a mesma célula alvo, porém, gerando efeitos específicos. Além do mais, ainda podem ser secretadas durante eventos não imunológicos, desempenhando papéis não relacionados à resposta imune (KHAN, 2008).

Geralmente são divididas de acordo com suas principais ações biológicas, existindo então, as interleucinas mediadoras da imunidade inata, as mediadoras da imunidade adaptativa e as estimuladoras da hematopoiese (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Algumas delas estão demonstradas na TABELA 6, sendo quatro delas (IL-1, IL-6, IL-10. TNF-α) melhores descritas a seguir.

**TABELA 6 -** PRINCIPAIS FUNÇÕES DAS CITOCINAS

| Nome | Fonte | Alvo | Funções biológicas |
|---|---|---|---|
| **IL-1 (α e β)** | Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e outros tipos celulares | Linfócitos B e Th, outros tecidos | Ativação celular |
| **IL-2** | $Th_1$ | Linfócitos Tc e Th, células NK | Proliferação e indução da atividade de linfócitos B e NK |
| **IL-3** | Linfócitos $Th_1$ e $Th_2$, mastócitos, células NK | Mastócitos e células hematopoiéticas | Proliferação de células progenitoras e diferenciação |
| **IL-4** | Linfócito $Th_2$, mastócitos, célula NK | Linfócitos T e B, mastócitos e macrófagos | Proliferação celular, Indução da expressão de MHC de classe II |
| **IL-5** | Linfócitos $Th_2$, mastócitos | Eosinófilos | Proliferação e diferenciação celular |
| **IL-6** | Macrófagos, Linfócitos $Th_2$ | Células plasmáticas, linfócitos B e outros tipos celulares | Diferenciação e secreção de anticorpos |
| **IL-8** | Medula óssea, Timo | Neutrófilos | Quimioatraente |
| **IL-9** | Linfócitos $Th_2$ | Linfócitos Th, mastócitos e eosinófilos | Induz a resposta inflamatória |
| **IL-10** | Macrófagos, linfócitos $Th_2$, Mastócitos | Macrófagos, APC | Citocina anti-inflamatória |
| **IL-11** | Medula óssea | Progenitores de linfócitos B e outras células | Diferenciação |
| **IL-12** | Macrófagos e Linfócitos B | Linfócitos $Th_0$, Tc e NK | Proliferação e diferenciação (sinergia com a IL-2) |
| **IL-13** | Linfócitos Th | Macrófagos e linfócitos B | Inibição de citocinas inflamatórias, regulação da inflamação e infecções parasitárias |
| **IL-16** | Linfócitos Tc | Linfócitos Th | Quimiotaxia |
| **IL-18** | Células de linhagem hematopoiética e outras | Linfócitos T, e células NK | Citocina pro-inflamatória e fator de indução de INF-ɣ |
| **INF-α** | Leucócitos | - | Inibidor da replicação viral |
| **INF-β** | Fibrobastos | - | Inibidor da replicação viral |
| **IFN-ɣ** | Linfócitos $Th_1$ e Tc e células NK | Várias células, incluindo os macrófagos | Inibidor da replicação viral e da proliferação celular. |
| **TNF-α** | Macrófagos | | Citotoxicidade, indução de secreção de citocinas |
| **TNF-β** | Linfócitos B | Células tumorais, neutrófilos e macrófago | Citotoxicidade e fagocitose |

FONTE: Adaptado de KHAN (2008)

A Interleucina 1 (IL-1), é um polipeptídeo que desempenha importante papel em ambos os tipos de imunidade, porém na inata, atua como um importante mediador da resposta inflamatória. Os principais produtores desta citocina são células fagocíticas ativadas, como os macrófagos, porém outros tipos celulares como as células dendríticas, epiteliais, endoteliais, linfócitos B, astrócitos, fibroblastos também a produzam (DINARELLO, 1988, 1996; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; KHAN, 2008). Quando produzida em grande quantidade, atinge a circulação sanguínea, agindo como um hormônio, o qual induz alterações sistêmicas, como nos sistemas neurológico, metabólico, hematológico e endocrinológico. Já em baixas concentrações, pode permanecer associada à membrana plasmática gerando uma resposta endêmica, mediando à resposta inflamatória através de ação com células locais (DINARELLO, 1988; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Estas moléculas colaboram para a remodelagem dos tecidos mesenquimais através da destruição e reparação e, de outra forma, ativam linfócitos e desempenham importantes papeis na iniciação da resposta imunológica, além de serem altamente inflamatórias. Elas atuam sinergicamente com outras citocinas, em especial com o TNF-α. A sua multiplicidade de ações biológicas gera respostas adaptativas rápidas, melhorando os mecanismos de defesa do hospedeiro (DINARELLO, 1988; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008*;* KHAN, 2008).

A interleucina 6 (IL-6), é uma citocina pró-inflamatória presente na resposta imunológica, bem como em processos relacionados à reprodução, ao metabolismo ósseo e ao envelhecimento. É sintetizada por células fagocíticas mononucleares, endoteliais vasculares, fibroblastos e, em outras células em resposta: a traumas, a queimaduras, a lesões teciduais, a IL-1 e, em menor grau, ao TNF-α. Nestas duas últimas mencionadas, a reação imune gerada, é denominada de resposta de fase aguda. Nos macrófagos, em especial, a IL-6 é liberada quando ocorre a ligação dos receptores *Toll-like* (TLR) a padrões a PAMPs, que correspondem a substâncias comumente encontradas em microrganismos, como o LPS, unidades de manose e ácidos teicóicos (KHAN, 2008; CRUVINEL *et al*., 2010). A resposta da fase aguda e a febre também são causadas pela IL-6 em conjunto com a IL-1 e TNF-α. Ainda gera influência sobre a diferenciação de linfócitos B e na estimulação de neutrófilos e, em altas concentrações, pode atuar no tecido muscular, gerando contrações musculares.

O fator de necrose tumoral (TNF-α) é uma glicoproteína pró-inflamatória e o nome se refere a “fatores” induzidos por infecções bacterianas, que esporadicamente, causavam a regressão de tumores. Apresenta uma vasta gama de efeitos biológicos em defesa do hospedeiro contra patógenos. Na célula, é capaz de induzir a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, bem como em certas condições, a morte celular por apoptose e necrose. As respostas biológicas induzidas por ele, são mediadas através de dois receptores estruturalmente distintos, o receptor de necrose tumoral tipo I (TNF-R1 - *Tumor necrosis factor receptor type I*) e o receptor de necrose tumoral tipo II (TNF-R2 - *Tumor necrosis factor receptor type II*), que estão presentes na membrana de quase todos os tipos celulares. O TNF-RI, segue para via apoptótica ou pró-inflamatória, enquanto o TNF-RII interage com moléculas da família de fator 2 associados ao TNF (TRAF - *receptor-associated factor 2 family*). Seu maior produtor são os macrófagos, especialmente ativados com endotoxinas. Outras células que o produzem, incluem as endoteliais, após danos teciduais, os linfócitos T estimulados com antígenos, NK e mastócitos ativados. A citocina INF-ɣ, aumenta a síntese de TNF-α. É um mediador da imunidade inata e adquirida. Ele apresenta a capacidade de fazer com que as células endoteliais vasculares expressem mais moléculas de adesão, aumenta a mobilização e a função efetora de neutrófilos e monócitos. Induz a produção de IL-1, IL-6 e mais TNF-α, através da estimulação dos macrófagos. Atua como um sinalizador de inflamação endógeno, que atua sobre as células reguladoras no hipotálamo induzindo a febre (LYSIAK, 2004; POPA *et al.,* 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; KHAN, 2008; WU; HYMOWITZ, 2010).

A interleucina 10 (IL-10), foi primeiramente descrita como sendo um inibidor de IFN-ɣ sintetizado em linfócitos $Th_1$. Hoje em dia, sabe-se que a IL-10 é uma importante citocina imunorreguladora, com atuação anti-inflamatória, pela inibição da síntese de citocinas envolvidas no processo inflamatório, como a IL-2, IL-3, GM-CFS, TNF-α e INF-ɣ como também pode inibir a si mesmo e as citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e IL-18. O seu caráter supressor atua como regulador do equilíbrio entre os linfócitos $Th_1$ e $Th_2$, pois é um promotor da resposta de $Th_2$ através da inibição da produção de INF-ɣ pelas $Th_1$. As $Th_1$ são células envolvidas na resposta dos linfócitos T citotóxicos, enquanto as $Th_2$ regulam a atividade e função dos linfócitos B. A IL-10, atua como supressora de macrófagos, desta forma, inibindo a apresentação de antígeno e a mediação de moléculas pró-inflamatórios. É produzida

principalmente por células imunitárias ativas, como os monócitos/macrófagos, linfócitos $Th_2$ e mastócitos. Linfócitos T também a produzem, com o intuito de inibir a atividade das células NK estimuladas por infecção viral. A sua atuação é através de um complexo de receptores transmembrana, como o IL-10R1 e IL-10R2. O receptor antagonista de IL-1, IL-1RA, é expresso em resposta a esta interleucina (COUPER; BLOUNT; RULEY, 2008; KHAN, 2008; SABAT *et al*., 2010).

4.5.1.3 Polissacarídeos vegetais com atividades biológicas sobre o sistema imunológico

As moléculas modificadoras da resposta biológica (MRB) pertencem à classe de imunomoduladores e são agentes que modificam a resposta biológica do organismo por meio da estimulação do sistema imunológico, a qual pode resultar em efeitos terapêuticos, como demonstrado na FIGURA 15 (BOHN; BEMILLER, 1995; SANTA, 2006). Numerosos estudos têm explorado os efeitos dos polissacarídeos, extraídos de diferentes fontes, sobre o sistema imunitário inato, mais especificamente, sobre a função dos macrófagos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; SHEU; LAI, 2012).

Estudos com polissacarídeos MRBs vegetais, demonstraram que estes polímeros apresentam a capacidade de aumentar a atividade citotóxica dos macrófagos frente a células tumorais e microrganismos. Esta capacidade, está relacionada com o estímulo da atividade fagocitária, bem como com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Os MRBs, também podem aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como: TNF-α, IL1-β, IL-6, IL-8, IL-12, INF-ɣ e INF-β2, como ilustrado na FIGURA 16. Como resultado, a modulação da imunidade inata gera, no hospedeiro, uma resposta mais rápida e potente contra uma diversidade de patógenos (BEUTLER, 2004; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Outra característica favorável destes MRBs é que além das funções citadas, eles ainda apresentam, geralmente, toxicidade baixa e efeitos colaterais quase nulos, o que em polissacarídeos imunomoduladores bacterianos ou em compostos sintéticos é um grande problema (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

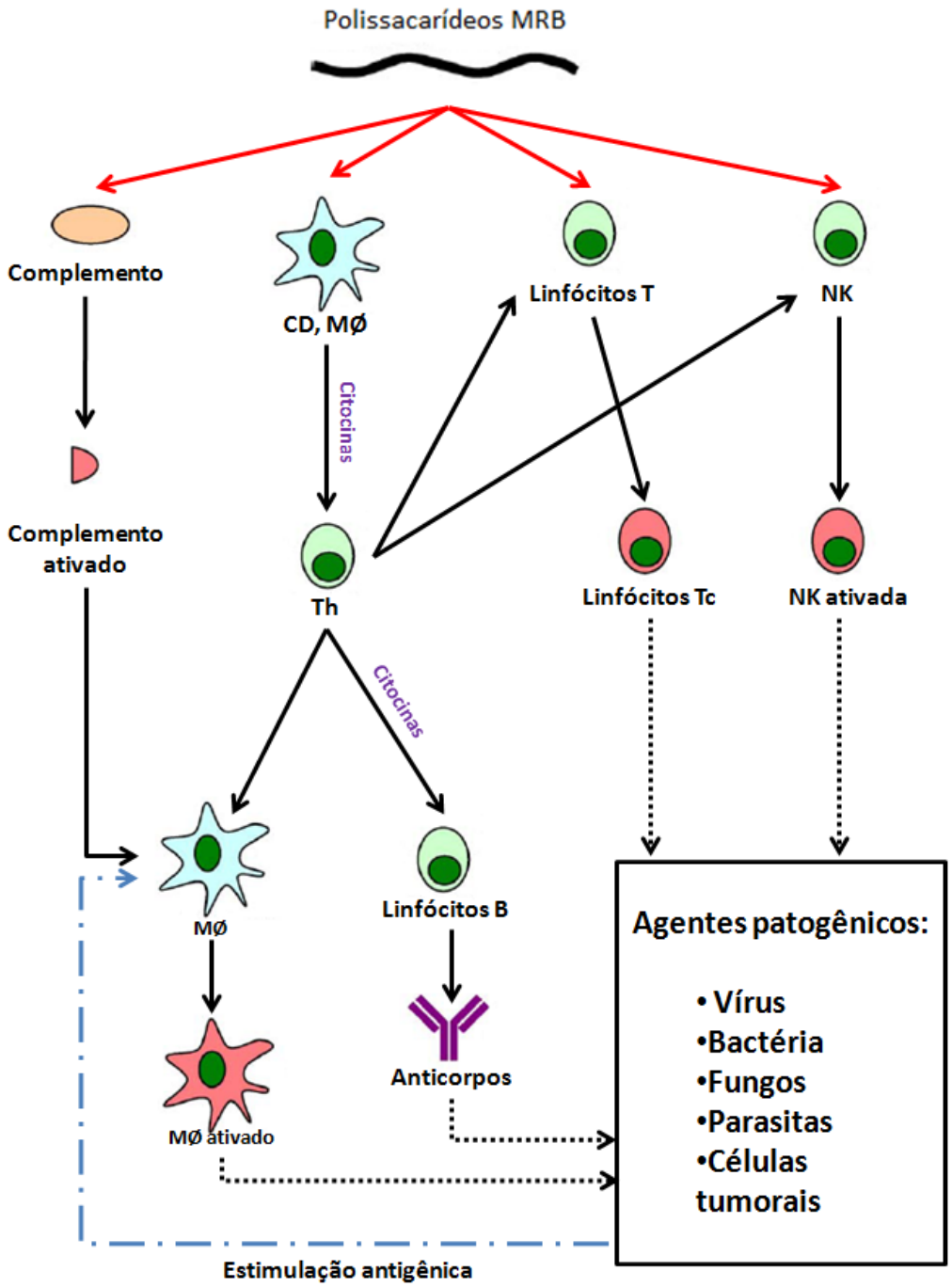



**FIGURA 15 -** MODELO PROPOSTO DA RESPOSTA GERAL DO SISTEMA IMUNOLÓGICO ATIVADO POR POLISSACARÍDEOS MRBs
FONTE: Adaptado de LEUNG *et al*. (2006); SCHEPETKIN; QUINN (2006).
NOTA: Os polissacarídeos MRB podem ativar de forma direta (setas vermelhas) as vias do sistema complemento, os macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e as células NK. Os MRB, também podem atuar na ativação do sistema imune de forma indireta, através da ativação dos macrófagos e das células dendríticas, que por sua vez, secretam citocinas, como a IL-1, que estimulam a segregação de outras citocinas pelos linfócitos Th, a qual modulam/ativam mais macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células NK para a destruição de agentes patogênicos. **CD** - células dendríticas; **MØ** - macrófagos; **Th** - Linfócitos T *helper*; **NK** - células *Natural Killer*; **Linfócitos Tc** - Linfócitos T citotóxicos.

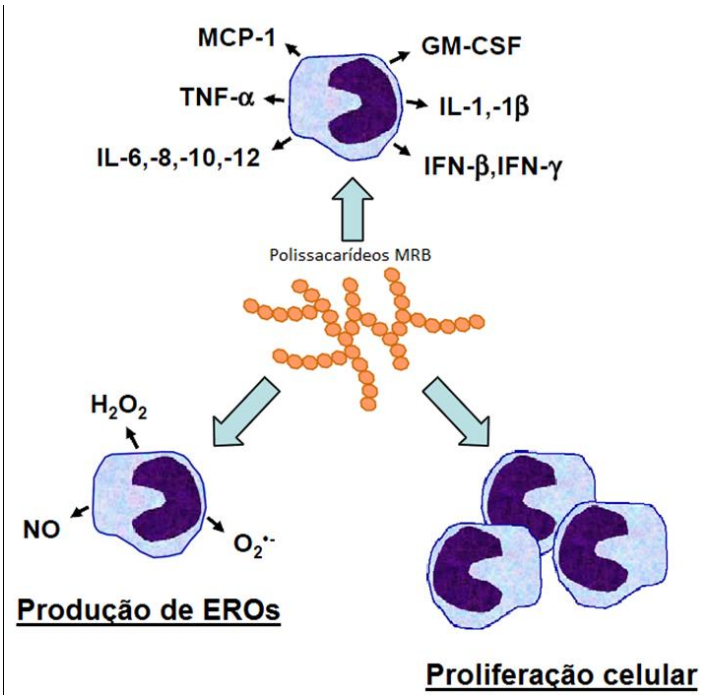



**FIGURA 16 -** MODELO PROPOSTO DA RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS ATRAVÊS DA ATIVAÇÃO POR POLISSACARÍDEOS MRBs
FONTE: Adaptado de LEUNG *et al*. (2006); SCHEPETKIN; QUINN (2006)
NOTA: **IL** - Interleucinas; **IFN** - Interferon; **TNF-α** - Fator de necrose tumoral α; **GM-CFS** - Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos; **MCP-1** - Proteína quimiotática de monócitos 1; **NO** - Óxido nítrico.

Relatos da literatura demonstram que aspectos relacionados com a massa molecular, o grau de polimerização, o grau de ramificação, a conformação e as ligações glicosídicas dos polissacarídeos, possam ser as características relacionadas com a capacidade destas moléculas em ativar o sistema complemento e a imunidade inata (LEUNG *et al.,* 2006; SHEU; LAI, 2012). Os polímeros provenientes de fontes vegetais, que apresentam a capacidade MRB, são aqueles que apresentam alta diversidade monossacarídica, bem como grande teor de ácidos urônicos e ramificações complexas. Estas características citadas, estão presentes em pectinas de parede celular primária (LEUNG *et al.,* 2006). Na TABELA 7 encontram-se alguns relatos de polissacarídeos pécticos e glicoconjugados que apresentam atividade biológica relacionada sobre o sistema imunológico.

A forma de reconhecimento dos polissacarídeos MRBs é através de proteínas transmembranas presentes nas células participantes do sistema imunológico - como os macrófagos. Dentre as proteínas, encontram-se os receptores de reconhecimento padrão (PRRs - *pattern recognition receptors*) e proteínas plasmáticas. As PRRs são

moléculas do sistema imune, que reconhecem estruturas moleculares conservadas, nesse caso, padrões moleculares associados a patógenos, que são compartilhadas por um grande número de microrganismos. Dentre deste grupo, encontram-se os receptores *Toll-like* (TLR) e os *Scavenger* (SRs) os quais, reconhecem polissacarídeos MRBs (GORDON, 2002; LEUNG *et al*., 2006). Já as proteínas plasmáticas mais estudadas, que reconhecem MRBs, são as lectinas de ligação de manose (MBL - *mannose binding lectin*) e as proteínas das vias clássicas e alternativa do sistema complemento.

**TABELA 7** - POLISSACARÍDEOS VEGETAIS COM ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

| Planta | Parte usada | Polímero | Atividade relatada |
|---|---|---|---|
| *Achyrocline satureiodes* (Macela) | Partes aéreas | Pectinas | Aumento da fagocitose de granulócitos e efeito sobre o sistema complemento[1] |
| *Angelica acutiloba* (Angelica japonesa) | Raízes | Pectinas e AG | Atividade antitumoral e efeito sobre o sistema complemento[1] |
| *Artemisia princeps* (Artemísia japonesa) | Folhas | Pectinas | Efeito sobre o sistema complemento[1] |
| *Curcuma longa* (Açafrão da terra) | Rizomas | Pectinas | Melhoria da fagocitose e efeito sobre o sistema complemento[1] |
| *Echinacea purpurea* (Equinácia) | Raízes e partes aéreas | Pectinas e AG | Estimulação de macrófagos[1] |
| *Urtica dioica* (Urtiga) | Raízes | Pectinas | Aumento da proliferação de linfócitos[1] |
| *Plantago major* (Tanchagem) | Folhas | Pectinas e AG | Indução de TNF-α e ativação do sistema complemento[1] |
| *Echinacea pallida* | Raízes | AGP | Aumento da proliferação *in vitro*, de linfócitos murinos[2] |
| *Baptisia tinctoria* (Índigo selvagem) | Raízes | AGP | Aumento da produção *in vitro* de IgM, por linfócitos e nitrito e IL-6 em macrófagos alveolares murinos[2] |
| *Larix sp.* ( *Larch* ) | - | *Larch* - AG (ResistAid™) | Suplementação com a AG, reduziu o número de episódios de infecções das vias respiratórias superiores em voluntários. Acredita-se que o efeito é causado pela ação imunomoduladora da AG[3]; Imunoestimulante sobre a imunidade adquirida[4] |

FONTE: O autor; [1] - PAULSEN (2001); [2] - CLASSEN *et al*. (2006); [3] - RIEDE; GRUBE; GRUENWALD (2013); [4] - UDANI *et al*. (2010).

### 4.5.2 Conceitos básicos do estresse oxidativo

Os processos bioquímicos são umas das grandes forças motrizes que sustentam a vida. Porém, essas reações podem originar moléculas danosas ao organismo, chamados de radicais livres ou espécies reativas (ER). Estas moléculas podem ser originadas através de reações metabólicas normais, bem como por meio de fatores exógenos, como: exposição à radiação, fuligens, poluentes do ar e, de forma indireta, através do metabolismos de certos solventes, drogas e pesticidas. (MACHLIN; BENDICH, 1987)

As fonte endógenas de radicais livres incluem aquelas moléculas geradas e que atuam de forma intracelular e as que são formadas dentro das células e liberadas para o meio extracelular. Os intracelulares são gerados a partir das oxidações de pequenas moléculas, como flavinas reduzidas e tióis e através da atividade de certas oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases. As oxidases e os sistemas de transporte de elétrons, são as principais fontes intracelulares e contínuas de espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS - *reactive oxygen species*), quando derivados do metabolismo do oxigênio, e espécies reativas de nitrogênio (ERN ou RNS - *reactive nitrogen species*) quando derivadas do metabolismo de nitrogênio (MACHLIN; BENDICH, 1987; RAHMAN, 2007).

O local de geração dos radicais livres abrange todos os constituintes celulares, incluindo mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, retículo endoplasmático, membrana plasmática e sítios específicos localizados no citosol. Estas moléculas incluem os radicais hidroxilas, peroxil e alcoxilânio, os ânions superóxido e hipoclorito, além de moléculas reativas como o peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete (MACHLIN; BENDICH, 1987).

Se estas moléculas ficarem livres dentro de um organismo vivo podem gerar danos oxidativos extremamente prejudiciais, pois a falta de elétrons na sua órbita externa faz com que as ER reajam com moléculas próximas, que estejam aptas a doar elétrons. Como por exemplo, as ER podem reagir com os lipídeos insaturados das membranas, gerando queda na fluidez e alinhamento de receptores e em casos mais drásticos, pode causar a lise celular. Estas moléculas ainda podem reagir com as enzimas, causando sua desnaturação, aos ácidos nucléicos gerando danos ao DNA que podem provocar mutações, muitas vezes de perfil cancerígeno, bem como

aos carboidratos, alterando a funções de receptores celulares, incluindo os de respostas hormonais e neurotransmissores.

Algumas destas moléculas podem ser benéficas, dependendo do ambiente e condições a qual são geradas, como por exemplo, nas reações de defesas imunológicas causadas por agentes infecciosos. No caso do exemplo citado, os macrófagos ativados apresentam um maior consumo de oxigênio, num processo chamado *burst* respiratório, que origina uma variedade de EROs/ERNs, incluindo ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, sendo este último utilizado na defesa antimicrobiana, processos inflamatórios e angiogênese (MACHLIN; BENDICH, 1987; MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; RAHMAN, 2007).

Para regular os efeitos das EROs/ERNs existem moléculas, que equilibram as suas ações, chamadas de antioxidantes. Essas substâncias incluem enzimas naturalmente presentes no organismo ou moléculas obtidas através da alimentação ou sintéticas. Estas moléculas atuam através da inibição da iniciação ou propagação da oxidação em cadeia, além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas EROs/ERNs (AMES, SHIGENAGA; HAGEN, 1993; HALLIWELL, 2007; RAHMAN, 2007).

#### 4.5.2.1 Polissacarídeos com atividade antioxidante

Os sistemas antioxidantes endógenos muitas vezes são insuficientes para evitar totalmente os danos causados pelas ER. Devido a isto, muita atenção tem se voltando para a utilização de materiais que apresentem a capacidade antioxidante. Nas indústrias alimentares os antioxidantes de natureza sintética, como a etoxiquina, metabissulfito, butil hidroxianisol (BHA) e butil hidroxitolueno (BHT) são amplamente utilizados. Porém, estudos toxicológicos e nutricionais demonstram que o uso destes antioxidantes pode apresentar efeitos tóxicos e prejudiciais para o ser humano. Desta forma, atualmente recomenda-se a restrição e/ou a troca pelos antioxidantes de origem natural (SATI *et al.,* 2010; KONG *et al.,* 2010).

Biomateriais naturais, como os polissacarídeos de diferentes fontes, vêm se mostrando potentes agentes antioxidantes (KONG *et al.,* 2010). Na literatura existem diversos polissacarídeos vegetais que apresentam capacidades antioxidantes, e alguns deles estão listados na TABELA 8.

**TABELA 8** - POLISSACARÍDEOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

| Nome cientifíco e popular | Parte utilizadas | Polímero | Ensaio utilizado | Referência |
|---|---|---|---|---|
| *Lycium chinense* *Lycium barbarum* (Goji)[1] | Frutos | Fração péctica rica em Ara e Gal | ORAC [1] / TEAC [2] | FAN; MAZZA; LIAO, 2010 |
| *Actinidia chinensis* (Kiwi ) | Frutos | Pectina | ORAC [1] / TEAC [2] | FAN; MAZZA; LIAO, 2010 |
| *Vaccinium macrocarpon* (Cranberry) | Frutos | Fração péctica | ORAC [1] / TEAC [2] | FAN; MAZZA; LIAO, 2010 |
| *Prunus avium* (Cereja) | Frutos | Fração péctica rica em Ara | ORAC [1] / TEAC [2] | FAN; MAZZA; LIAO, 2010 |
| *Dendrobium denneanum* (Orquídea Dendróbio) | Caule | Fração rica em Glc, Gal e Man | *Scavenger* do Radical Hidroxila [3] | LUO *et al.,* 2011 |
| *Aloe vera* (Babosa) | Folhas | Pectina | Tiocianato Férrico[4] | AMMAR *et al.,* 2010 |
| *Opuntia ficus-indica* (Fígo-da-Índia) | Frutos | Pectina | Tiocianato Férrico[4] | AMMAR *et al.,* 2010 |
| *Citrus paradisi* (Toranja) | Frutos | Pectina | Tiocianato Férrico[4] | AMMAR *et al.,* 2010 |
| *Tamarindus indica* (Tamarindo) | Sementes | Pectina | Tiocianato Férrico[4] | AMMAR *et al.,* 2010 |

Fonte: O autor.
NOTA: [1] - Método da capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC- *Oxygen radical absorbance capacity*); [2] - Método da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC- *Trolox equivalent antioxidant capacity*); utilizando o composto ABTS (A (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]); [3] - Método *Scavenger* do radical hidroxila (capacidade *scavenger* de radicais livres formados em espécies menos reativas ); [4] - Método Tiocianato férrico (Inibição da peroxidação do ácido linoléico).

Os compostos sintéticos, na maioria das vezes, apresentam maior atividade antioxidante quando comparado aos produtos naturais. Porém, os polissacarídeos vegetais que apresentam a capacidade antioxidante, geralmente, apresentam outras atividades biológicas como: antibacteriano, antivirais e antitumorais bem como podem atuar como inibidores de metástases e de agregações plaquetárias. Desta forma, demonstrando que a utilização de compostos naturais é mais vantajosa em relação aos produtos sintéticos e que dietas ricas em frutas e vegetais é de extrema importância para a saúde humana (MOURE *et al*., 2001).

# 5 MATERIAL E MÉTODOS

## 5.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS FRUTOS DE *Abelmoschus esculentus*

Os frutos inteiros, frescos (900 g) e cultivados em sistemas orgânicos foram adquiridos comercialmente (C.T.M.A Hortifruti LTDA - Colombo, BR) e mantidos sob refrigeração (4 ºC) até sua utilização.

Para o processamento dos mesmos, sem lavagem prévia, os pedúnculos e as sementes foram retirados, tendo o cuidado em manter intactas as regiões dos septos, pericarpos, mesocarpos e endocarpos (FIGURA 17).

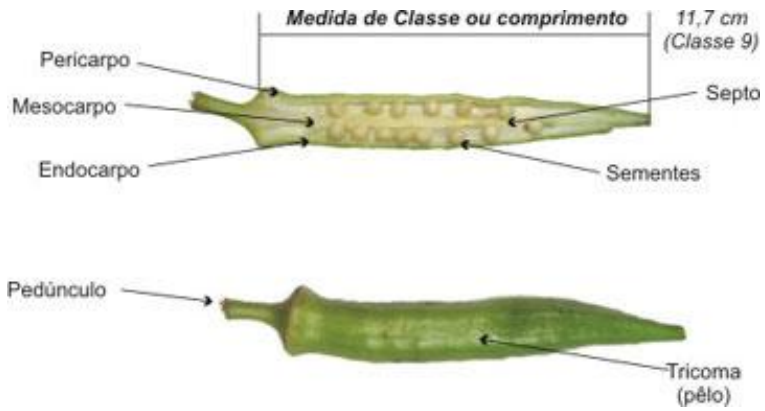



**FIGURA 17** - DETALHES DAS ESTRUTURAS PRESENTES NOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: Federação da agricultura do estado do Paraná (FAEP).

As partes separadas e frescas (frutos, sementes e pedúnculo - FIGURA 18 A) foram secas em estufa a 60 ºC durante 72 h, e posteriormente, o material seco foi pesado (FIGURA 18 B e C). As sementes e os pedúnculos secos foram armazenadas a 4 ºC para futuras utilizações. Os frutos livres e secos foram triturados grosseiramente em liquidificador e deslipidificados sequencialmente (4 vezes) em solução de tolueno e etanol (TOL:ETOH, 2:1, v/v), sob sistema de refluxo a 60 ºC durante 30 min (FIGURA 19). Após cada procedimento o material foi filtrado em sistema a vácuo. O resíduo resultante foi utilizado na deslipidificações seguinte enquanto que os filtrados obtidos foram descartados. Após o último procedimento, o resíduo gerado foi transferido para placas de petri a qual permaneceram durante 72 h na capela para secagem.

**FIGURA 18 -** PROCESSAMENTO DAS SEMENTES, DOS PEDÚNCULOS E DOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O autor
NOTA: Fruto denominação utilizada para regiões dos septos, pericarpos, mesocarpos e endocarpos **A**: Detalhe das regiões dos frutos frescos separadas (frutos, sementes e pedúnculos); **B** e **C**: Detalhe das sementes e frutos secos, respectivamente.

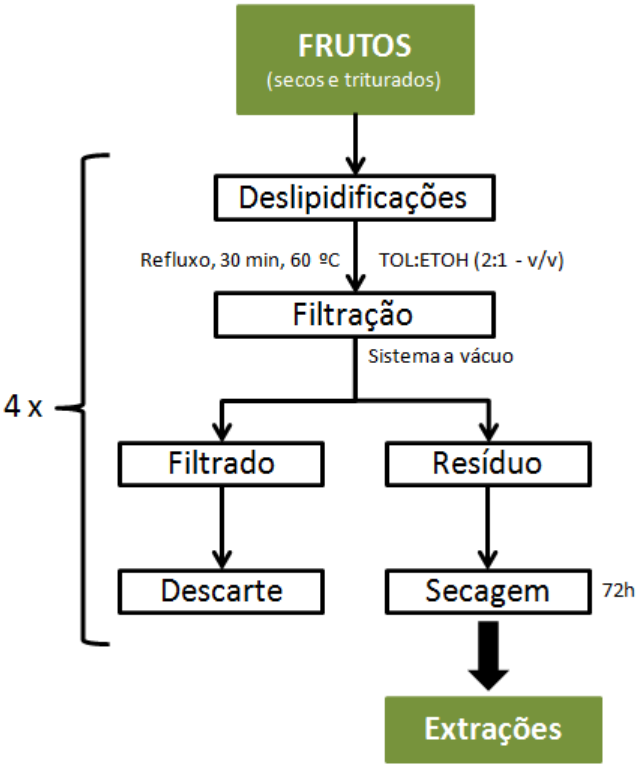



**FIGURA 19** - FLUXOGRAMA DO PRODECIMENTO DE DESLIPIDIFICAÇÃO SEQUENCIAL REALIZADOS NOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O Autor

## 5.2 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*

### 5.2.1 Extrações aquosas

Para a obtenção das frações, o material seco e deslipificado foi submetido a extrações aquosas sequenciais, sendo quatro à temperatura ambiente (25 ºC) e uma à temperatura de 60 ºC (chamada de extração à quente).

As extrações aquosas à temperatura ambiente foram realizadas sob agitação mecânica (modelo EEQ-9034, Edutec, Astral científica, Curitiba - BR), utilizando volume padrão (900 mL) de água destilada durante 30 min. Após, o material foi filtrado, em sistema a vácuo (modelo 131, Prismatec, Itu - BR). Todos os sobrenadantes obtidos foram precipitados com três vezes o seu volume em etanol e o resíduo gerado, seguiu para a extração seguinte. Este procedimento gerou as frações W-1, W-2, W-3 e W-4. Para a extração aquosa a quente, foi realizado o mesmo procedimento, porém, em banho-maria (60 ºC) durante 1 h, gerando a fração HW (FIGURA 20).

### 5.2.2 Extrações com ácido cítrico

As extrações com ácido cítrico foram realizadas utilizando o resíduo resultante da extração aquosa a quente. Foram realizadas quatro extrações sequenciais, seguindo o protocolo mencionado anteriormente, porém, utilizando solução de ácido cítrico (900 mL) em diferentes concentrações (0,1 e 1% - m/v) e em temperaturas distintas (60 ºC e banho-fervente). Cada extração durou 1 h e geraram as frações 0.1Ca, 0.1Ca(2), 1Ca e 1Ca(2), como demonstrado na FIGURA 20.

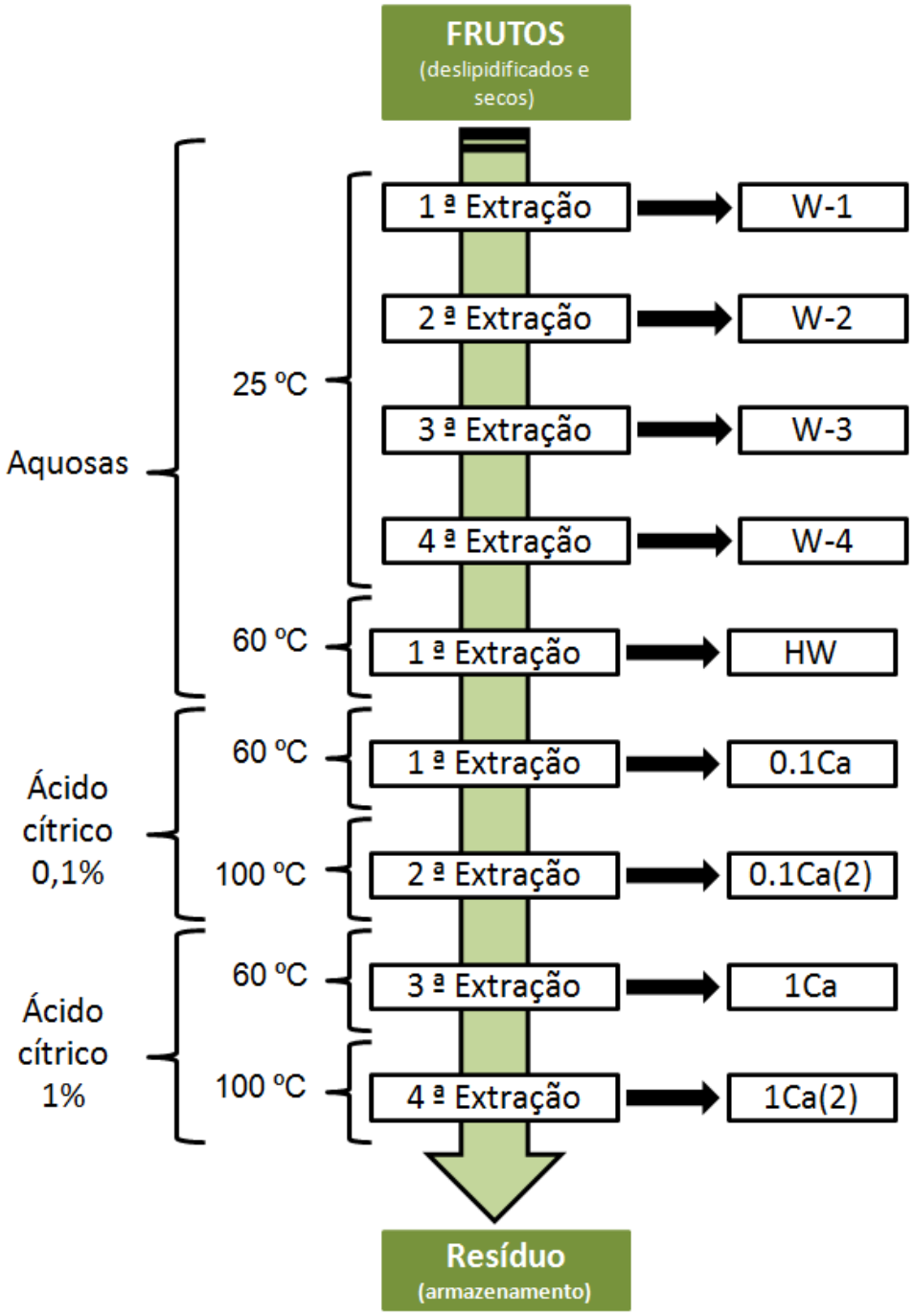



**FIGURA 20** - FLUXOGRAMA DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS REALIZADAS NOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O Autor

Todas as frações precipitadas foram separadas do sobrenadante etanólico, solubilizadas em água destilada, liofilizadas e armazenadas a 4 ºC até a sua utilização. Com o material liofilizado, foram realizados os cálculos de rendimento de cada amostra em relação à massa do material inicial, bem como do deslipidificado.

## 5.3 ANÁLISES QUÍMICAS

### 5.3.1 Dosagens colorimétricas

Todas as frações polissacarídicas obtidas foram analisadas quando ao teor de carboidrato total, ácido urônico, proteína total, compostos fenólicos e grupamentos acetil. Estas análises consistiram do cálculo de cada percentagem em relação às curvas analíticas, confeccionadas com padrões correspondentes para cada experimento.

As amostras das frações polissacarídicas foram solubilizadas em $H_2O$ destilada e em concentrações específicas para cada experimento. Para os ensaios citados, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro de microplacas (modelo EPOCH, BioTek, Winooski - EUA) utilizando microplacas de fundo chato e de 96 poços (Techno Plastic products, TPP AG®, Trasadingen - CH).

#### 5.3.1.1 Carboidrato total

A dosagem dos teores de carboidratos totais foi realizada através do procedimento descrito originalmente por Dubois *et al.* (1956) e adaptado por Fox e Robyt (1991). Esse ensaio tem como princípio a microdeterminação quantitativa de açúcares simples e seus derivados metilados, oligossacarídeos e polissacarídeos, através da análise espectroscópica na região do visível da coloração característica formada, amarelo-alaranjada. Soluções de D-galactose (Merck, Darmstadt - DE) em concentrações de 4, 8, 16, 24, 30 e 40 µg/mL, foram utilizadas na confecção da curva, utilizada para calcular a percentagem de carboidratos totais de cada amostra.

Para a realização deste teste, um volume de 40 µL de cada uma das amostras (1mg/mL) foram transferidas a microtubos tipo *eppendorf* juntamente com 40 µL da solução de fenol a 5% (m/v). A solução foi homogeneizada em agitador de tubos (modelo QL-901, Vertéx, BR) e, posteriormente, houve a adição cuidadosa de 200 µL de ácido sulfúrico ($H_2SO_4$) concentrado. Novamente, houve a homogeneização da solução e incubação em estufa (100 ºC) durante 10 min. Após o resfriamento em banho de gelo a mistura resultante foi transferida para microplacas

e analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. As amostras e os brancos (amostra e experimento) foram analisados em triplicata.

5.3.1.2 Ácidos urônicos

A quantificação do teor de ácidos urônicos foi determinada através de um método adaptado do descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Este método utiliza a reação do *m*-hidroxibifenil, a qual é adequada para análises de pectinas e polímeros ricos em ácidos urônicos por apresentar baixa interferência, colorimétrica, de açúcares neutros (FILISETTI-COZZI; CARPITA, 1991). A sensibilidade do teste é de 4 a 40 µg/mL e o ácido D-glucurônico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO - EUA) foi utilizado como padrão.

Para este ensaio, 100 µL das amostras (1mg/mL) e 10 µL de sulfamato de potássio (4 M, pH 1,6) foram transferidos para microtubos tipo *eppendorf*, a qual foram homogeneizados em agitador de tubos. Posteriormente, ocorreu a adição de 600 µL de tetraborato de sódio (75 mM em $H_2SO_4$), seguida da homogeneização em agitador de tubos e incubação, em estufa, a 100 ºC durante 15 min. Após esse tempo, foi adicionado 10 µL da solução de *m*-hidroxibifenil a 0,15% (m/v em hidróxido de sódio aquoso 0,5%, m/v). A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso durante 10 min. Passado o tempo, a leitura foi realizada no comprimento de onda de 525 nm. As amostras e o brancos (amostra e experimento) foram analisados em triplicatas.

5.3.1.3 Proteína total

Para a dosagem do conteúdo de proteína total, foi utilizado um método adaptado de Bradford (1976), que utiliza o corante aniônico *Coomassie Brilliant Blue* G-250. Este corante pode apresentar dois aspectos diferentes. Um deles, equivale à forma vermelha, que apresenta absorbância máxima em 470 nm e corresponde a forma catiônica do corante. O outro denota a conversão do vermelho em azul, gerando a forma aniônica do corante, a qual é capaz de se ligar as proteínas e sua absorbância máxima é encontrada em 595 nm (BRADFORD, 1976).

Para o procedimento deste ensaio, foram adicionados 40 µL das amostras, em concentração de 10 mg/mL e triplicata, em microtubos tipo *eppendorf*. Em seguida, adicionou-se 40 µL do reagente de proteína e a solução foi homogeneizada em agitador de tubos. A leitura das amostras foi realizada em comprimento de onda de 595 nm.

O reagente de proteína consiste em 40 mg de *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO - EUA) dissolvidos em 20 mL de metanol a 95%, 40 mL de ácido *o*-fosfórico e quantidade suficiente de água destilada para completar o volume final de 1000 mL. Para a elaboração da curva padrão, foi utilizada albumina bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO - EUA) nas concentrações de 4 a 40 µg/mL.

5.3.1.4 Compostos fenólicos

Para a determinação do teor compostos fenólicos, foi empregado o microensaio adaptado de Singleton e Rossi (1965) o qual utiliza o reagente de *Folin - Ciocalteau*. Este reagente consiste de uma solução de íons complexos, formados a partir dos heteropoliácidos fosfomolíbdico e fosfotúngstico. A base do método se pela transferência de elétrons dos compostos fenólicos para os complexos fosfomolíbdico/fosfotúngstico do reagente, formando a coloração característica. A reação é favorecida em meio alcalino, a qual é gerada pela adição de carbonato (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007; MORAIS *et al*., 2009; RIVELLI, 2010). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras utilizando uma curva padrão constituída por ácido gálico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO - EUA), em concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL.

Para este ensaio, em microtubos tipo *eppendorf* foi adicionado 20 µL das amostras, em triplicata e em uma concentração de 5 mg/mL, e 100 µL do reagente *Folin - Ciocalteu* a 10% (Cromato Produtos Químicos, Sp - BR). A solução foi homogeneizada em agitador de tubos e, subsequentemente, foi adicionado 80 µL de carbonato de sódio ($Na_2CO_3$) a 7,5% (m/v). A mistura foi agitada novamente e, por fim, os tubos foram aquecidos, em estufa a 50 ºC durante 5 min. Após o resfriamento, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 760 nm.

5.3.1.5 Grupamentos acetil

Os grupamentos acetil foram determinados pelo método descrito por Hestrin (1949). Este método, se baseia na capacidade das cadeias esterificadas dos ácidos carboxílicos em reagir com a hidroxilamina, em solução alcalina, gerando o ácido hidroxâmico. Por sua vez, o ácido hidroxâmico, reage quantitativamente com o cloreto férrico ($FeCl_3$), formando a coloração característica amarelo-amarronzado. Quão forte for a coloração para o marrom, maior o conteúdo de grupamentos *O*-acetil.

Este ensaio, consistiu na adição, em microtubos tipo *eppendorf,* de 125 µL das amostras (10 mg/mL em cloreto de sódio 0,1%, m/v) e 250 µL da solução composta de hidróxido de sódio 3,5 M e cloreto de hidroxilamina 2 M (1:1, v/v). Após repouso de 1 min, foram adicionados 125 µL de ácido clorídrico (1:3, v/v, em $H_2O$) e 125 µL da solução de cloreto férrico 0,185 M. As amostras foram lidas no comprimento de onda de 540 nm.

Para a curva padrão, foi utilizado a glucose pentacetato (GPA) nas concentrações de 0,1 a 0,8 µg/mL e como o branco do experimento, foi utilizada, no lugar das amostras, a solução de NaOH 0,1% (m/v).

5.3.2 Ensaio de difusão radial em gel de agarose com reagente Yariv β-glucosil (*Single diffusion*)

Com o propósito de estimar a quantidade de arabinogalactana-proteína (AGP) nas frações polissacarídicas obtidas, foi utilizado o método descrito por Van Holst e Clarke (1985), que envolve a precipitação, seletiva, das AGPs através do reagente 1,3,5-tri(*p*-glicosiloxifenilazo)-2,4,6-trihidroxibenzeno (Yariv β-glucosil ou β-GlcY) (KITAZAWA *et al.,* 2013).

Para a realização do ensaio, primeiramente, foi preparado o gel de agarose 1% (m/v) em solução de NaCl a 1% contendo 0,02% (m/v) do reagente β-GlcY. Após, a solução do gel foi aquecida e com o auxílio de uma pipeta de vidro, 4 mL do gel foi derramado sobre uma película de poliéster (GelBond®) com a parte hidrofílica voltada para cima, disposta sobre uma placa de vidro. Em seguida, após o repouso para resfriamento, poços, com diâmetro de aproximadamente 3 mm, foram

confeccionados com auxílio de uma pipeta pasteur de vidro, sob vácuo. Aos poços, foram pipetados 4 µL da solução padrão de goma arábica (Sigma-Aldrich - St Louis, MO - EUA) (0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,6 µg/mL) e das amostras (10 mg/mL), como esquematizado na FIGURA 21. As placas foram incubadas em câmara úmida durante 24 h. Após o período, foram realizadas as medições dos halos vermelho-amarronzados formados (reação positiva) com auxílio de um paquímetro e a quantificação das AGPS foi calculada em relação às curvas padrões obtidas ($R^2$ = 0,9736; $R^2$ = 0,9882).

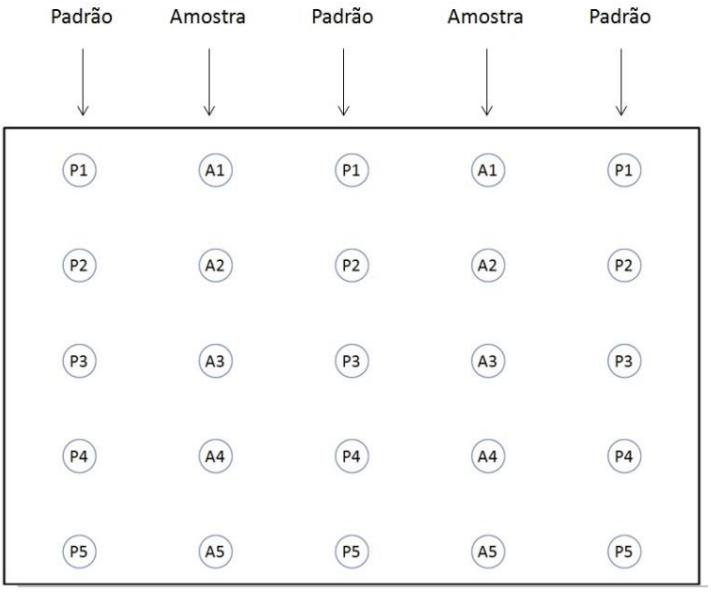



**FIGURA 21** - MODELO ESQUEMÁTICO DA DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS NA PLACA DE GEL AGAROSE CONTENDO β-GlcY
FONTE: O autor
NOTA: **Padrões** - P1: 0,05 µg/mL; P2: 0,1 µg/mL; P3: 0,2 µg/mL P4: 0,4 µg/mL e P5: 0,6 µg/mL de goma arábica, em triplicata. **Amostras** - A1 a A5 diferentes amostras, na concentração de 10 mg/mL, em duplicata.

### 5.3.3 Análises cromatográficas

#### 5.3.3.1 Cromatografia de camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel, consiste de uma técnica de adsorção líquido-sólido através da separação pela diferença de afinidade dos componentes presentes em uma solução pela fase estacionária (COLLINS;

BRAGA; BONATO, 2006; SASSAKI *et al.,* 2008). Esta técnica foi utilizada para a análise qualitativa da composição monossacarídica das frações obtidas.

Para isso 5 mg das amostras foram previamente hidrolisadas com 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 2,5 M, durante 8 horas a 100 ºC. Passado o tempo o TFA foi evaporado e as amostras ressolubilizadas em 500 µL de $H_2O$ destilada. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em cromatoplacas (Sigma-Aldrich, St Louis, MO - EUA) recobertas com sílica gel e eluídas com fase móvel constituída de uma solução de acetato de etila:*n*-propanol:ácido acético: água, na proporção de 4:2:2:1 (v/v), em cuba de vidro previamente saturada com a solução.

Após a corrida, as placas foram reveladas utilizando a solução de orcinol 0,5% (m/v, em etanol e ácido sulfúrico) e aquecimento a 100 ºC, até o aparecimento da coloração. Os componentes monossacarídeos presentes foram identificados comparando com a coloração e fator de retenção ($R_f$) daquelas observados nas soluções padrões.

5.3.3.2 Cromatografia de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALLS/RI)

As análises de homogeneidade, foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) (Waters, Massachusetts - EUA) contendo colunas conectadas em série de gel permeação Ultrahydrogel 200, 500, 250 e 120 (Waters, Massachisetts - EUA) com limites de exclusão de $7.10^6$, $4.10^5$, $8x10^4$ e $5x10^3$ g/moL, respectivamente. O dispositivo é acoplado em série ao detector de espalhamento de luz laser, comprimento de onda de 632 nm, multiângulos, 18 ângulos (MALLS) (modelo DSP-F, Wayatt Technology, Califórnia - EUA) e ao detector de índice de refração (RI) (modelo 2410, Waters, Massachusetts - EUA). Para análise e processamento dos resultados, foi utilizado *software* ASTRA (versão 450, Wayatt Technology, Massachusetts - EUA). Como eluente, foi utilizada a solução de nitrito de sódio 0,1 mol/L ($NaNO_2$) e 200 ppm de azida de sódio ($NaN_3$) em um taxa de fluxo de 0,6 mL/min, controlada através de bomba peristáltica Waters 515 (Massachusetts - EUA).

Para a análise da homogeneidade, 1 mg de cada fração foi solubilizado, durante 12 h, em 1 mL da solução de $NaNO_2$ 0,1 M e $NaN_3$ 200 ppm. Em seguida,

para remoção da parte insolúvel, o material foi filtrado, sob pressão positiva, em membranas acetato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore, Massachusetts - EUA).

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

a) Composição monossacarídica neutra

Para a determinação da composição dos monossacarídeos neutros, as amostras foram derivatizadas até acetato de alditóis e posteriormente analisadas em cromatógrafo a gás VARIAN SATURN 2000R (modelo 3800, Palo Alto, CA - EUA) acoplado a um espectrômetro de massa VARIAN ION TRAP 2000R (Palo Alto, CA - EUA), equipado com coluna capilar de sílica fundida DB 225 (30m x 0,25 mm). O hélio ultrapuro, foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. As amostras injetadas, foram aquecidas até 50 ºC, e permaneceram nesta temperatura durante 1 min, em seguida, houve o aumento gradual de 40 ºC/min, até o máximo de 220 ºC.

A hidrólise dos materiais foi semelhante à realizada por Peng *et al*. (2014). Os polissacarídeos (aproximadamente 1 mg) foram submetidos à hidrólise ácida total com 1 mL de TFA 2 M, durante 5 horas a 120 °C. Após, o ácido foi completamente removido pela adição de água ao sistema, seguida de liofilização. As amostras hidrolisadas foram reduzidas pela adição de boroidreto de sódio ($NaBH_4$) e incubação por 24 h. A solução obtida foi então neutralizada com ácido acético e evaporada até secura. O excesso de borato, formado na reação, foi removido por co-destilação com metanol até que a solução apresentasse caráter límpido. Após secagem, procedeu-se a acetilação, com 0,5 mL de anidrido acético a 100 °C, durante 1 hora. Posteriormente, foi executada a partição com clorofórmio, lavagens com bicarbonato de sódio aquoso e $H_2O$ destilada até que a fração aquosa atingisse o pH em torno da neutralidade (WOLFROM; THOMPSOM, 1963a, b). Os monossacarídeos na forma de acetatos de alditóis foram extraídos da fase clorofórmica e então analisados em cromatógrafo gasoso.

5.3.3.4 Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD*)*

Para a confirmação do ácido urônico presente na fração W-1, foi realiza a análise em cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), utilizando o método adaptado ao descrito por Lina *et al.* (2006).

A fração W-1(6 mg) foi submetida à hidrólise ácida total, utilizando 6 mL de TFA (2 M), durante 2 h a 120 ºC em autoclave. Passado esse período, a amostra foi congelada e liofilizada, para a retirada do ácido. Este procedimento foi realizado até que o pH da amostra atingisse o valor equivalente ao da água ultrapura. Após a amostra resultante foi ressolubilizada em 6 mL água ultrapura (0,1 mg/mL) e filtrada sob pressão positiva em membrana de acetato-nitrito de celulose com porosidade de 0,22 µm (Techno Plastic products, AG® TPP, Trasadingen - CH).

A amostra hidrolisada, livre de ácido, foi analisada em cromatógrafo modelo ICS-5000 Dionex™ (Thermo Scientific, San Jose, CA - EUA), utilizando como fase móvel a água ultra pura, solução de hidróxido de sódio (250 mM) e tampão de acetato de sódio (1 M).

Este sistema é constituído por bomba de gradiente GS50, com desgaseificador, detector eletroquímico ED50A (Eletrodo Au), amostrador automático AS50 em forno de cromatografia LC30 (30 ºC) e válvula de injeção com dispositivo para 25 µL. As amostras foram separadas em coluna de troca aniônica CarboPac PA20 (150 x 3 mm) e os resultados obtidos foram processadas em *software* Chromeleon 7.

5.3.4 Análises espectroscópicas

5.3.4.1 Espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)

Para complementar a caracterização das frações obtidas foi realizada análises no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, de espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR).

O teste em FT-IR, gera picos de absorção que indicam a presença de tipos específicos de ligações, desta forma, demonstrando a presença de grupamentos químicos.

Para a realização do experimento, 200 mg das amostras, desprovidas de umidade, foram misturadas e prensadas juntamente com brometo de potássio (KBr), até a formação de uma pastinha translúcida. Como branco empregou-se uma pastilha contendo apenas KBr. As pastilhas formadas foram então dispostas no equipamento BOMEM HARTMANN e BRAUN (modelo MB-série, Quebec - CA). Os espectros foram coletados no modo de transmitância na frequência de 4000 a 400 $cm^{-1}$, em resolução de 4 $cm^{-1}$ e 32 scans, processados em *software* Win-bomen Easy 3.04 e analisados com o software Bio-Rad®.

5.3.4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear monodimensional ($^{1}H$) e bidimensional ($^{1}H/^{13}C$-HSQC)

A amostra da fração polissacarídica de maior rendimento, W-1 (10 mg), foi solubilizada em aproximadamente 700 µL água deuterada ($D_2O$) e, posteriormente transferida para tubo de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN unidimensional de $^{1}H$ e o bidimensional HSQC (*Heteronucelar Single Quantum Coherece Spectroscopy* - $^{13}C/^{1}H$) foram obtidos através de espectrômetro Bruker® - 400 MHz (modelo DRX Avance, Karlsruhe - DE), do Centro de RMN da Universidade Federal do Paraná.

Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) baseados no padrão interno acetona (δ 2,22 para $^{1}H$). Para o processamento dos espectros foi utilizado o *software* Topspin 1.3 - Bruker®.

5.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS - Ensaios *in vitro*

5.4.1 Imunomodulação

5.4.1.1 Reagentes

- Soro fetal bovino estéril foi adquirido da Laborclin (Curitiba, PR - BR).
- Meio essencial mínimo de Eagle (MEM) foi adquirido da Cultilab (Campinas, SP - BR).
- Azul de Tripan e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2-)-2,5-difenilmetiltetrazolio (MTT) foram adquiridos da Sigma - Aldrich (St Louis, MO - EUA).
- Corantes para avaliação morfológica, Hematoxilia e Eosina, foram gentilmente cedidos pelo Sr. Herculano S. Reis Filho do Laboratório de Histotecnologia (Departamento de Biologia Celular, UFPR).
- E os demais reagentes utilizados, apresentavam grau de pureza PA.

5.4.1.2 Material e equipamentos

- Placas de cultivo de 24 e 96 poços com tampa e fundo chatos e filtros com membrana de acetato-nitrito de celulose (0,22 µm) foram obtidas da Techno Plastic products AG® (Trasadingen -CH).
- Seringas estéreis descartáveis de 10 mL foram obtidas da BD (Curitiba - BR).
- A pesagem dos materiais foi realizada em balança analítica Marte, modelo AL 500 (Santa Rita do Sapucaí - BR).
- Para as medições do pH das soluções, utilizou-se pHmetro Gehaka, modelo PG 1800 (São Paulo - BR).
- As centrifugações foram realizadas em centrífuga QUIMIS® (Diadema - Brasil) e centrífuga refrigerada de bancada MPW Med Instruments, modelo MPW-350R (Warsaw - PL).
- Os materiais, como pipetas, ponteiras, soluções salinas, aparelhos de filtração e peças acessórias, foram esterilizadas em autoclave do modelo HA da Sercon (São Paulo - BR) durante 30 min, em temperatura de 120 ºC e 1 atm de pressão. As soluções termolábeis foram esterilizadas através de filtração sob pressão positiva em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm, Techno Plastic products AG® (Trasadingen - CH).
- Para secagem dos materiais foi utilizada estufa Odontobrás R13 (Ribeirão Preto - BR).

- Para a manipulação das culturas utilizou-se câmara de fluxo laminar vertical classe II A1 com filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) da Filterflux® (Piracicaba - BR).
- A incubadora de $CO_2$ utilizada, foi adquirida da Thermo Scientific (San Jose, CA - EUA) e as análises colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro para microplacas modelo EPOCH da BioTek (Winooski - EUA).
- As análises microscópicas de rotina foram realizadas em microscópio invertido modelo INV 100 da Bel Engineering (Monza - IT).
- As análises morfológicas e fotografias foram realizadas com a ajuda da Profª Drª Thelma Alvim Veiga Ludwig, utilizando microscópico Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - JP) (Departamento de Botânica, UFPR).

5.4.1.3 Soluções

- Para a manutenção celular: meio MEM enriquecido com 5% (v/v) de SFB estéril.
- Solução salina tamponada (PBS): solução de 40,5 mM de fosfato de sódio dibásico ($Na_2HPO_4$), 680 mM de cloreto de sódio (NaCl) e 7,3 mM de fosfato de potássio monobásico ($KH_2PO_4$). O pH foi ajustado a 7,4 e a solução foi esterilizada em autoclave durante 30 min e armazenada a 4 ºC. No momento do uso, a solução foi diluída cinco vezes com água ultrapura igualmente estéril.
- Soluções da fração W-1:
    - Solução-mãe (5 mg/mL): a amostra foi solubilizada durante 12 h em agitação magnética, em PBS contendo 50 µg/mL de polimixina B e esterilizada por filtração positiva em membrana de acetato-nitrito de celulose com porosidade de 0,22 µm (TPP - AG®);
    - Soluções teste: em ambiente estéril, fluxo laminar, a solução-mãe da fração W-1, foi diluída seriadamente em meio MEM estéril e enriquecido com 5% (v/v) de soro fetal bovino. As amostras testes

estéreis obtidas, 0,32, 1,25, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640 µg/mL, permaneceram sob refrigeração (4 ºC) até a utilização.

- Soluções controle:
    - Controle negativo: meio MEM enriquecido com  % (v/v) de soro fetal bovino;
    - Controle positivo: solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) (Sigma-Aldrich, St. Louis - EUA) na concentração de 50 ng/mL.
- Solução de hemólise: solução composta por tris (hidroximetil) aminometano 17 mM e cloreto de amônio 144 mM ($NH_4Cl$), com ajuste de pH a 7,4.
- Solução de azul de tripan: solução a 0,4% (m/v) em PBS.
- Solução de brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazil-2-il]-2,6 (MTT): solução na concentração de 5 mg/mL em PBS.
- Reagente de Griess: solução na proporção de 1:1 dos seguinte reagente - solução de sulfanilamida a 1% (m/v) (Sigma - Aldrich, St Louis - EUA) e solução de naftilenodiamida a 0,1% (m/v) (Sigma - Aldrich, St Louis - EUA), ambas em ácido fosfórico 2,5% (v/v).
- Solução de vermelho neutro: solução a 2% (m/v) em meio MEM.
- Solução de lise: ácido acético glacial 1% (v/v) em etanol 50% (v/v).

5.4.1.4. Animais

Os experimentos biológicos utilizaram como modelo experimental, camundongos fêmeas SWISS (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de vida, pesando entre 45-50 g. Estes animais foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR em ambiente controlado: fotoperíodo ciclo claro-escuro de 12/12 h, temperatura estável a 25 ºC e  agua e ração Nuvilab CR1 (Sogorb, Lapa, São Paulo - BR)  *ad libidum*.

Os procedimentos utilizados na experimentação destes animais, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com o projeto intitulado “Caracterização estrutural de polissacarídeos provenientes dos frutos de *Abelmoschus esculentus* L. Moench e suas atividades

biológicas *in vitro*" segundo o protocolo 683 do processo 23075.004353/2013-33 (ANEXO).

5.4.1.5 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

Após as eutanásias, a região abdominal de cada animal foi assepsiada com solução de álcool 70% (v/v), parar posterior exposição da membrana peritoneal. Com a ajuda de seringas e agulhas estéreis, 10 mL de PBS (4 ºC e pH 7,4) foram inoculados na cavidade peritoneal, a qual foi massageada vigorosamente. Após o lavado peritoneal, retirado com auxílio de uma seringa, foi transferido a tubos tipo *falcon* para centrifugação a 2500 rpm, durante 15 min a 4 ºC. O precipitado celular formado foi lavado com 10 mL de solução de hemólise e centrifugado, nas mesmas condições anteriores, para a remoção de hemácias remanescentes.

Através da técnica do corante vital azul de tripan, a viabilidade celular das células recém obtidas foi investigada (PHILLIPS, 1973). Esta técnica tem como princípio a capacidade do corante em penetrar nas células que apresentam danos na integridade da membrana celular. Desta forma, ocorrendo a distinção das células não viáveis, coradas, das viáveis, não coradas. Para o ensaio, foi transferido a um tubo com rosca, tipo *falcon*, uma alíquota de 10 µL da solução contendo as células e 90 µL da solução do corante azul de Tripan. Desta solução formada, 10 µL foram pipetados na câmara de Neubauer e a contagem de células viáveis, não coradas foi realizado. O número de células viáveis obtidas, serviu como base para o cálculo da diluição necessária para obter a concentração final de $5x10^5$ células/mL ou de $1x10^6$ células/mL (experimento com citocinas). O cálculo da percentagem de células viáveis foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \left[ \frac{\text{nº de céls não coradas}}{\text{n º de céls totais}} \right] X\ 100$$

Após o ajuste da concentração celular, específica para cada experimento, a suspensão celular resultante foi aliquotada em placas de cultura celular com fundo

chato estéril, a qual permaneceu sob atmosfera de 5% de $CO_2$, durante 1 h e a 37 ºC, para aderência celular. Após, para a remoção de eventuais células suspensas, as placas foram lavadas duas vezes com PBS estéril (pH 7,4 e 37 ºC). Por fim, o meio de cultura contendo as soluções testes da fração W-1 foi adicionado e os ensaios descritos a seguir foram realizados.

5.4.1.6 Determinação da viabilidade celular através do método do MTT

O ensaio com brometo do MTT, originalmente descrito por Mosmann (1983), se tornou um instrumento útil para a medição da citotoxicidade de substâncias *in vitro*. Este método se baseia na medida do metabolismo celular de glicídeos, através da avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais. A atividade celular é quantificada pela redução do sal tetrazólio (amarelado em estado oxidado) a cristais de formazan(azul/roxo em estado reduzido) que são solúveis em dimetilsulfóxido (DMSO) (FIGURA 22). O sal tetrazólio, não reage diretamente com as desidrogenases, mas sim com os produtos, NADH ou NADPH, provenientes das reações enzimáticas de células viáveis. Assim, quanto maior a coloração (absorbância) observada, maior a viabilidade celular e menor a citotoxicidade da fração teste (MACIEL *et al.,* 2002). A metodologia utilizada no presente trabalho foi descrita por REILLY *et al*. (1998).

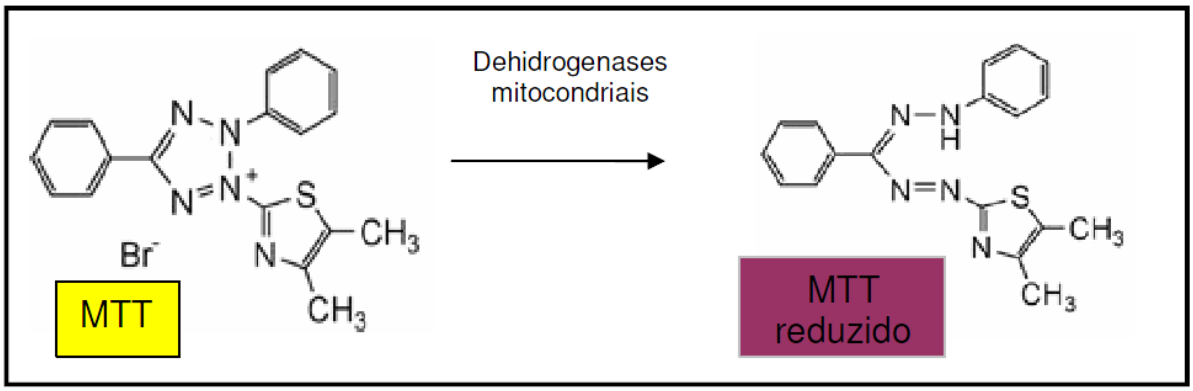



**FIGURA 22** - MODELO PROPOSTO PARA A REDUÇÃO DO MTT POR ENZIMAS MITOCONDRIAIS
FONTE: GOMES (2008)
NOTA: Redução do sal MTT a cristais roxos de formazan no interior da mitocôndria ocorre através de ação enzimática (FEDERMAN *et al.,* 2009).

Em placas de 96 poços contendo $5x10^5$ célula/poço (100 µL da solução de suspensão celular de $5,0x10^6$ células/mL), previamente incubadas para adesão das células, foram lavadas duas vezes com PBS estéril (pH 7,4). Em cada poço foi adicionado o meio MEM contendo as amostras testes descritas anteriormente, nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL. Além destas, foram realizados o controle positivo e o negativo e o cultivo ocorreu durante 24 e 48 h.

Passado o tempo, o meio de cultura foi retirado e, em cada poço foi adicionado 180 µL de meio MEM e 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL), tornando a concentração da solução final do MTT de 500 µg/mL. As células foram novamente incubadas durante 3 h sob as mesmas condições já descritas, e após, ocorreram as lavagens com PBS (2x, 37 ºC, pH 7,4) para remoção do excesso do MTT e os cristais de formazan formados intracelularmente, foram diluídos em 200 µL de DMSO. A leitura das absorbâncias das placas foi realiza em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm e como branco, foi utilizado o DMSO.

5.4.1.7 Dosagem do óxido nitrito através do reagente de Griess

O óxido nítrico (NO•) quando em solução, rapidamente se oxida, formando o nitrito e nitrato, que são produtos estáveis e não voláteis. Desta forma, a dosagem da quantidade de NO• produzido pelos macrófagos, é realizada de forma indireta, através da mensuração do nitrito ($NO_2^-$) do sobrenadante, que interage com o reagente de Griess, gerando um composto de coloração lilás (GREEN *et al.,* 1982).

As placas de 96 poços, contendo $5x10^5$ células/poço, foram adicionados as amostras testes (5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL em meio MEM), que permaneceram em atmosfera contendo 5% de $CO_2$, a 37 ºC durante 24 e 48 h. Passado o período de incubação, 100 µL de cada sobrenadante foi transferido para novas placas de 96 poços, juntamente com 100 µL do reagente Griess. Após repouso durante 10 min, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 550 nm e o cálculo da concentração de nitrito foi realizada em relação à curva padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$) diluído em meio de cultura, nas concentrações de 10 a 100 µM. Os resultados foram expressos como quantidade de nitrito produzido em µM/$5x10^5$ células. Como controle negativo, as células foram cultivadas ausência das frações (somente meio MEM enriquecido com 5% (v/v) de soro fetal bovino) e o controle positivo, as células

foram cultivadas com solução de LPS na concentração de 50 ng/mL em meio de cultura.

5.4.1.8 Avaliação da retenção de lisossomos através do método do vermelho neutro

Para a avaliação da retenção de lisossomos, foi utilizado o corante vital vermelho neutro, segundo protocolo descrito por Pipe, Coles e Farley (1995). Neste ensaio, placas de 24 poços, previamente incubadas durante 1 h, 37 ºC e 5% de $CO_2$, contendo $1x10^6$ células/poço (200 µL da suspensão de $5x10^5$ células/mL), foram tratadas com 1 mL das amostras nas concentrações de 5, 20, 80 µg/mL, durante 24 h (37 ºC, 5% de $CO_2$). Após o sobrenadante foi retirado e armazenado sob refrigeração (-80 ºC) para o ensaio da dosagem de citocinas, descrito no tópico 4.4.1.9. Os poços remanescentes, foram lavados duas vezes com PBS estéril (37 ºC), em seguida adicionou-se de 180 µL do meio MEM e 20 µL da solução de vermelho neutro estéril, e as placas, então foram, novamente, incubadas nas mesmas condições durante 30 min. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado, e as células foram lavadas mais duas vezes com PBS (pH 7,4) e rompidas com 100 µL da solução de lise. As absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 550 nm e os resultados foram expressos em percentagem de retenção de lisossomos e comparadas com a obtida dos controles positivo (LPS, 50 ng/ml) e negativo (macrófagos crescidos na ausência das frações), sendo este último considerado como 100% de retenção.

5.4.1.9 Dosagem de citocinas produzidas pela cultura de macrófagos peritoneais

A dosagem foi realizada com o sobrenadante obtido da incubação de $1x10^6$ células/poço, crescidas na ausência (controle negativo) e na presença das frações (5, 20, 80 µg/mL) ou da solução de LPS (controle positivo, 50 ng/mL), como descrito no tópico 4.4.1.8 (retenção de lisossomos). Estas amostras, após a coleta, foram centrifugados (2000 rpm, 5 min) e armazenados até a utilização, sob refrigeração a -80 ºC, na forma de 4 alíquotas (250 µL) em tubos tipo *eppendorf* estéreis,

destinadas, cada uma, as dosagens das citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α), em duplicata.

Este ensaio foi realizado através do método imunoenzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando kits específicos (eBioscience, San Diego, CA - EUA) para cada citocina. As placas de poliestireno (*high binding protein* - catálogo nº 9018, Corning, Lowell, MA - EUA) de 96 poços utilizadas, foram sensibilizadas durante 18 h a 4 ºC com 100 µL/poço do anticorpo de captura para cada citocina. Posteriormente, as mesmas, foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (Tween - 20, 0,05%, v/v, em PBS) em lavadora de placas (Bio Teck, Winooski - EUA) e os poços foram bloqueados com 200 µL/poço da solução de diluição (*Assay diluent*). Após 1 h de incubação a temperatura ambiente e cinco ciclos de lavagens (Tween-20), foram adicionados 100 µL/poço das amostras (sobrenadantes) ou os padrões específicos para cada citocina (diluídos seriadamente de cada um). As placas foram novamente incubadas (à temperatura ambiente, 2 h) e lavadas (5 vezes), para posterior adição de 100 µL/poço do anticorpo de detecção e nova incubação à temperatura ambiente, durante 1 h. Após, ciclo de cinco lavagens, foi adicionado 100 µL/poço da enzima Avidina-HRP, e novamente, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, durante 30 min. Passado o período e ciclo de lavagem (7 vezes), 100 µL/poço do substrato cromógeno da enzima Avidina-HRP (tetrametilbenzidina - TMB) foram adicionados. A reação prosseguiu através de incubação (à temperatura ambiente) durante 15 min. Por fim, a reação foi parada com 50 µL/poço de $H_2SO_4$ (1N) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 450 nm. A concentração de citocinas foi determinada através de uma curva padrão preparada com oito concentrações de cada padrão das citocinas testadas (IL-1β, IL-6, IL10 e TNF-α). Os resultados foram expressos como quantidade de citocinas produzidas em pg/mL/1x$10^6$ células, através de comparação com os controles positivo (células incubadas com 50 ng/mL de LPS) e o negativo (células incubadas somente com o meio MEM).

5.4.1.10 Análises morfológicas

Em placas de 24 poços, contendo uma lamínula em cada poço, 100 µL da suspensão celular ($1x10^6$ células/poço) foram incubadas, durante 24 h, a 37 ºC e 5% de $CO_2$, na ausência (controle negativo, somente meio), na presença da fração W-1, 1 mL nas concentrações de 0,32, 1,25, 5, 20, 80, 160, 320 e 640 µg/mL ou da solução de LPS (controle positivo, 50 ng/mL). Após o período, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas foram fixadas com solução de Bouin, durante 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a desidratação com acetona, diafanização com xilol e coloração com Hematoxilina e Eosina. As lâminas permanentes foram montadas com resina Entellan® e as fotomicrografias foram realizadas no Departamento de Botânica da UFPR, utilizando microscópico Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - JP).

5.4.2 Ensaios antioxidantes

Os ensaios antioxidantes, foram realizados em modelos experimentais *in vitro*, utilizadas todas as frações obtidas na concentração de 1 mg/mL. Os reagentes utilizados, apresentavam grau PA e as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro para microplacas modelo EPOCH da BioTek (Winooski - EUA).

5.4.2.1 Ensaio da formação do complexo fosfomolibdênio

A avaliação da capacidade antioxidante relativa das amostras, foi determinada pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Esse ensaio baseia-se na redução, provocada pela amostra, do molibdênio na forma Mo(VI) para Mo(V), que então reage com o fosfato em meio ácido, gerando o complexo fosfomolibdênio, que apresenta coloração verde, que pode ser quantificada espectrofotometricamente.

Para esta determinação, 0,3 mL das amostras e 3 mL do reativo foram transferidos a tubos de ensaio, que posteriormente foram incubados em banho-maria a 95 ºC durante 90 min. Passado o tempo, houve o resfriamento e leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 695 nm. O reativo utilizado foi preparado na hora, através da mistura de sódio monobásico 28 mM (28 mL), molibdato de amônio 4 mM (12 mL), ácido sulfúrico 0,6 M (20 mL) e quantidade suficiente de $H_2O$ destilada para completar o volume final de 1000 mL.

O cálculo da atividade antioxidante relativa foi realizada em relação a apresentada pelo ácido ascórbico, na concentração de 200 µg/mL (m/v em metanol), seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{ARR\% ác. ascórbico} = \left[\frac{\text{Abs da amostra - abs do branco}}{\text{Abs do ác. ascórbico - abs do branco}}\right] \text{X } 100$$

Onde:

ARR% ác. Ascórbico = Atividade antioxidativa relativa a do ácido ascórbico;

Abs da amostra = Absorbância média apresentada pelas amostras (triplicata)

Abs do branco = Absorbância média do branco, metanol no lugar das amostras (triplicata)

Abs do ác. Ascórbico = Absorbância média apresentado pelo padrão utilizado, ácido ascórbico

5.4.2.2 Ensaio do método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Para o ensaio antioxidante das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) foi utilizada a metodologia adaptada de Morais *et al*. (2005) e descrita originalmente por Kishida *et al.* (1993). O ensaio tem como base a quantificação de um dos principais produtos secundários formado pela auto-oxidação e degradações enzimáticas de hidroxiperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, o malonaldeído (MDA). Quanto menor a mensuração, maior será a atividade antioxidante protetora contra a lipoperoxidação (HODGES *et al*., 1999).

O MDA, formado *in vitro*, através da indução da peroxidação pelo ABAP (2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina), reage com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico

(TBA), em meio acidificado e sob condições elevadas de temperatura, formando uma solução com a coloração rosa, a qual pode ser quantificada através da leitura em espectrofotômetro, gerando a mensuração da peroxidação lipídica (HODGES *et al*., 1999).

Para a avaliação das frações polissacarídeos obtidas, aos tubos de ensaio, foram transferidos 100 µL das amostras (1 mg/mL), 400 µL de $H_2O$ destilada e 500 µL de uma solução de gema de ovo a 5% (m/v em dodecil/lauril sulfato de sódio - SDS - *sodium dodecyl sulfate* - 0,55%) , 50 µL de 2,2'-(2-amidinopropano) (ABAP) 0,07 M, 1,5 mL de ácido acético 20% (v/v) e 1,5 mL de TBA 0,4% (m/v em SDS). Após incubação, em banho-maria, a 95 ºC durante 60 min, resfriamento e adição de 1,5 mL de *n*-butanol, os tubos permaneceram sob repouso durante 10 min, para posterior centrifugação (3000 rpm, 15 min). A leitura foi realizada em 532 nm, utilizando fase butanólica dos tubos e índice antioxidante foi calculado em relação à atividade do butil hidroxitolueno (BHT) segundo a seguinte fórmula:

$$IA\% = \left[ 1- \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle}} \right] X\ 100$$

Onde:

IA% - Índice oxidante

Abs da amostra = Absorbância média das amostras (quadruplicata)

Abs do controle/branco = Absorbância média do controle, água no lugar da amostra (quadruplicata)

5.4.2.3 Ensaio antioxidante da capacidade de quelação de $Fe^{2+}$

Para a análise da habilidade quelante de íons ferrosos ($Fe^{2+}$) pelas amostras foi utilizado o método descrito primeiramente Stookey (1970) e modificado por Decker e Welch (1990). Neste ensaio é utilizada a molécula 3-(2-piridil)-5,6-difenil1,2,4-triazina4',4''-sal dissulfônico de sódio, comercialmente denominada de FerroZine®, que apresenta a capacidade de formar complexos colorimétricos com um dos mais poderosos íons metálicos pró-oxidativos, o $Fe^{2+}$. A capacidade

quelante, é mensurada pela habilidade da amostra em estudo, em competir com o FerroZine® na quelação dos $Fe^{2+}$, desta forma, caso a amostra em questão apresente a atividade, a absorbância do experimento diminuirá, pela menor formação do complexo FerroZine®/ $Fe^{2+}$ (KONG *et al.,* 2010).

Para o procedimento experimental, primeiramente, foram adicionados 500 µL das amostras (1 mg/mL) em tubos de ensaio lavados *overnight* em solução de HCl 0,1 M. Posteriormente, foram adicionados 185 mL de $H_2O$ ultra pura e 50 µL de cloreto ferroso ($FeCl_2$) 2 M. Após a homogeneização e repouso durante 10 min, 100 µL de FerroZine® 5 mM foram adicionados e a solução final foi incubada durante 10 min a 37 ºC. Passado o tempo e o resfriamento, a leitura foi realizada no comprimento de onda de 562 nm. Como branco da amostra foi utilizada a $H_2O$ ultra pura no lugar do $FeCl_2$, e no branco do experimento, $H_2O$ ultra pura no lugar da amostra. O padrão utilizado para controle foi ácido etileno diamino tetracético (EDTA), na concentração de 100 µg/mL. O cálculo da percentagem da capacidade de quelação do íon $Fe^{2+}$ foi realizado segundo a fórmula:

$$Q\,\% = 1 - \left[ \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle}} \right] X\ 100$$

Onde:

Q% = Percentagem da capacidade quelante.

Abs da amostra: Média das absorbâncias obtidas das amostras (triplicata)

Abs do controle/branco: Média das absorbâncias obtidas do EDTA (triplicata)

### 5.4.3 Análises estatísticas

Todos os resultados obtidos, nos experimentos biológicos, foram expressos como média ± desvio padrão (M ± dp). Os resultados obtidos dos experimentos da atividade imunomoduladora, foram submetidos à análise multifatorial de variância ANOVA e teste de Tukey, considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância $p<0,05$ (VIEIRA, 1991).

# 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1 OBTENÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS PROVENIENTES DOS FRUTOS DE *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Os frutos frescos (900 g) foram separados em pedúnculo, sementes e o fruto propriamente dito (regiões de septos, pericarpos, mesocarpos e endocarpos). Todo o material gerado foi seco. As regiões dos pedúnculos e das sementes foram armazenadas (4 ºC) para futuras utilizações e os frutos obtidos foram deslipidificados gerando uma massa seca final de 56,49 g. Todos os rendimentos obtidos estão demonstrados na TABELA 9.

**TABELA 9** - RENDIMENTO DO MATERIAL APÓS SECAGEM E DESLIPIDIFICAÇÃO

| | Frescos | Secos | Deslipidificado e secos |
|---|---|---|---|
| **Frutos** | 641,1 | 57 | 56,49 |
| **Sementes** | 140 | 18,73 | - |
| **Pedúnculo** | 118,9 | 12,28 | - |
| **Total** | 900 | 88 | 56,49 |

FONTE: O autor
NOTA: Dados apresentados em gramas (g). (**-**) não realizado.

Posteriormente à massa seca e deslipidificada dos frutos foram realizadas extrações para obtenção de frações ricas em polissacarídeos, sendo as quatro primeiras aquosas à temperatura ambiente (25 ºC, sob agitação mecânica, 30 min), uma aquosa à temperatura quente (60 ºC, sob agitação mecânica,1h) e as quatro últimas utilizando solução de ácido cítrico (0,1 e 1%, m/v) em temperaturas distintas (60 ºC e banho fervente), gerando um total de nove frações polissacarídicas, como demonstrado na FIGURA 23 A.

Todas as frações obtidas são solúveis em água, da mesma forma descrito por El-Mahdy e El-Sebaiy (1984), porém, em função de seu aspecto viscoso (FIGURA 23 B), é necessário um tempo maior para que ocorra a solubilização completa. Amin (1956), relatou caso semelhante, com a fração obtida da extração ácida (HCl, 0,1 N, 24 h) dos frutos de *A. esculentus*, e ainda descreveu que a substância obtida, de aparência amorfa e branca, era insolúvel em solventes orgânicos e muito solúvel em

alcalinas, gerando uma solução viscosa. Isso também foi relatado por Bhat e Tharanathan (1986), onde a mucilagem obtida, através de extrações ácidas (HCl 0,1 M, 4 ºC, 6-8 h) dos frutos de *A. esculentus*, gerou um material de difícil solubilização em água pura, porém, solúvel em solução aquosa de 1% (m/v) de boroidreto de sódio.

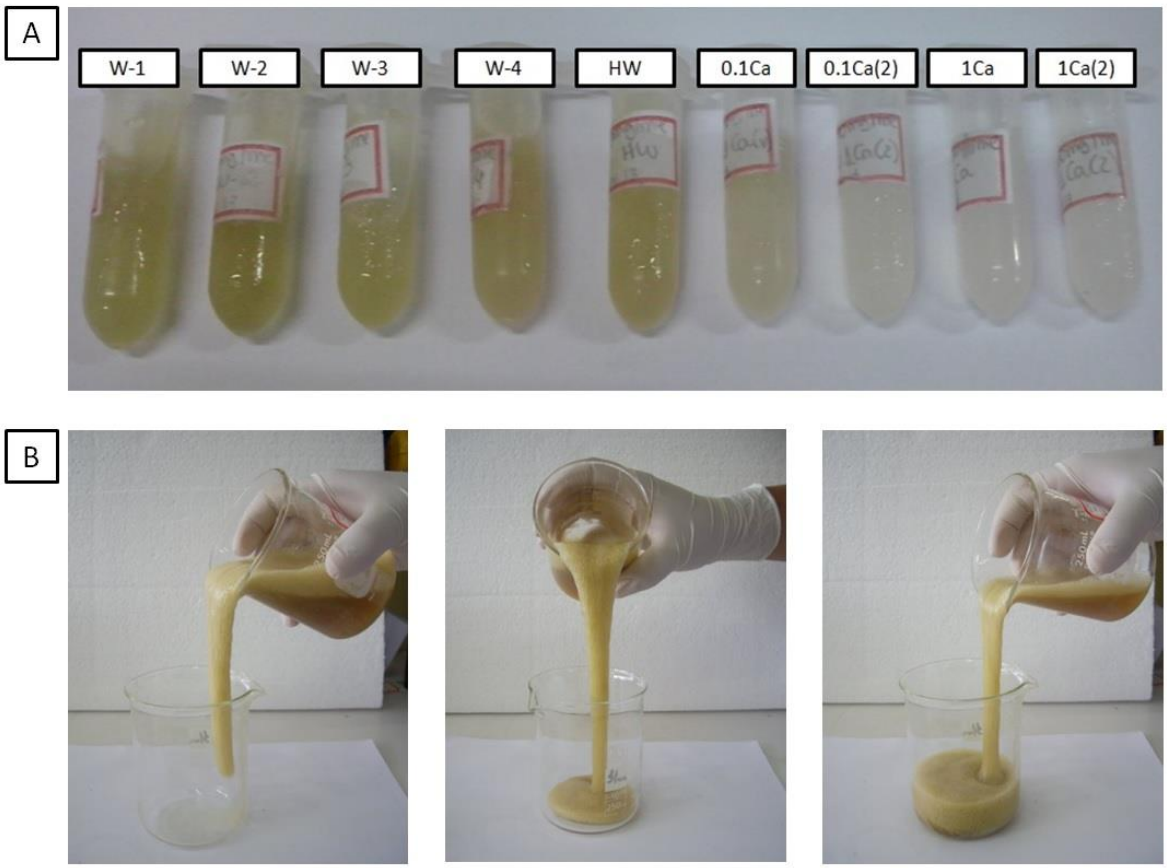



**FIGURA 23** - FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS PROVENIENTES DOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O autor
NOTA: **A**: Aparência das amostras na concentração de 10 mg/mL; **B** - Comportamento viscoso da fração W-1. **W-1 a W-4** - Extrações aquosas sequenciais à temperatura ambiente (30 min); **HW**: Extração aquosa à quente (banho-fervente, 1 h); **0.1Ca a 1Ca(2) -** Extrações cítricas sequenciais, sob diferentes condições (0,1 e 1% de ácido cítrico, 60 ºC e banho-fervente, 1 h).

Em relação ao rendimento, a fração W-1 foi a que obteve o maior entre todas as frações, sendo de 16,4% (em relação à massa total das frações) e de 3,1% (em relação a massa deslipidificada e seca) seguida da fração W-2 16,1% (em relação a massa total das frações) e de 3% (em relação a massa deslipidificada e seca). Dentre as frações obtidas das extrações ácidas, a fração 1Ca(2) foi que obteve o melhor rendimento, cerca de 12,2% (em relação a massa total das frações) e de

2,3% (em relação a massa deslipidificada e seca), sendo a terceira entre todas, como demonstrado na TABELA 10. Os resultados demonstraram, que o método com água à temperatura ambiente e a cítrica (ácido cítrico 1%, banho-fervente) foram às condições que mais favorecem a extração das frações polissacarídicas.

**TABELA 10** - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*

| Frações | Rendimento | |
|---|---|---|
| | g | % [1] |
| **W-1** | 1,8 | 3,1 |
| **W-2** | 1,7 | 3,0 |
| **W-3** | 1,2 | 2,1 |
| **W-4** | 0,7 | 1,3 |
| **HW** | 1,0 | 1,7 |
| **0.1Ca** | 0,7 | 1,3 |
| **0.1Ca(2)** | 1,1 | 1,9 |
| **1Ca** | 1,2 | 2,1 |
| **1Ca(2)** | 1,3 | 2,3 |

FONTE: O autor
NOTA: [1] - Percentagem em relação a massa deslipidificada e seca (56,49 g).

O rendimento total, obtido somente das extrações aquosas à temperatura ambiente (30 min) foi de aproximadamente 0,85% em relação a massa dos frutos frescos. Este resultado foi inferior ao apresentado por Woolfe, Chaplid e Otchere (1977), onde em uma única extração aquosa à temperatura ambiente dos frutos de *A. esculentus*, o rendimento obtido foi de 1,6% em relação a massa fresca dos frutos frescos e por Whistler e Conrad (1954a), onde em uma extração aquosa à temperatura ambiente, dos mesmos frutos, o rendimento foi de 1,5%, em relação aos frutos frescos. Entretanto, ambos os autores não mencionam o tempo de extração. As extrações ácidas (ácido cítrico, 0,1 e 1%, m/v, 60 ºC e banho fervente, 1 h) geraram um rendimento total de aproximadamente 0,67% em relação a massa dos frutos frescos, Amin (1956) obteve 0,09% em apenas uma extração realizada durante 24 h com solução de ácido clorídrico (0,1 N). Sengkhamparn e colaboradores (2009a), realizaram quatro extrações sequenciais com os frutos de *A. esculentus*, sendo a com solução tampão (acetato de sódio 0,05M, 70 ºC, 30 min) e a com solução álcali diluída (hidróxido de sódio 0,05 M, boroidreto de sódio 20 mM,

0 ºC, 30 min), as extrações que geraram frações de maiores rendimento, 11,2% e 13,2% respectivamente. Com estes dados, pode-se sugerir, que o tempo de extração, bem como o solvente utilizado, podem interferir no rendimento final da extração.

## 6.2 ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*

### 6.2.1 Dosagens colorimétricas para determinação do conteúdo de carboidrato total, proteínas total, compostos fenólicos e grupamentos acetil

As frações obtidas dos frutos de *A. esculentus*, apresentaram em média 52% de carboidratos totais, de acordo com o método descrito por Fox e Robyt (1991). As frações 0.1Ca(2) - obtida da extração com banho-fervente e solução de ácido cítrico a 0,1% (m/v, 1h), HW - obtida da extração aquosa à quente (banho-fervente, 1 h) e a W-1 - obtida da primeira extração aquosa à temperatura ambiente (30 min) foram as que apresentaram os maiores teores de carboidratos totais, de aproximadamente 71%, 66% e 63,8% respectivamente, como demonstrado na TABELA 11.

Os trabalhos relacionados com polissacarídeos de *A. esculentus* carecem de informações relacionadas a quantificação do teor de carboidrato total. Lengsfeld e colaboradores (2004), relatam que a fração obtida da extração aquosa com precipitação etanólica de 45% (v/v) dos frutos de *A. esculentus,* exibiu alto conteúdo de carboidratos totais, pelo método resorcinol-ácido sulfúrico, porém não mencionou nenhum valor. As percentagens obtidas de carboidrato total no presente trabalho, foram inferiores a apresentadas por Sengkharmparn *et al*. (2009a) utilizando os frutos da mesma espécie vegetal e o padrão (Gal), entretanto, os solventes utilizados foram diferentes. O resíduo deslipidificado (solução etanólica 70%, v/v, temperatura ambiente e solução de clorofórmio:metanol, 1:1, v,v, 30 min) relatado por Sengkharmparn e colaboradores (2009a), apresentou um conteúdo de 57,5% de carboidrato total, segundo o método automatizado com orcinol-ácido sulfúrico. Após extrações sequenciais, este conteúdo alterou, sendo a extração com solução tampão (acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, 70 ºC) e com agente quelante (EDTA 0,05 M, acetato de sódio 0,05 M, oxalato de sódio 0,05 M, pH 5,2, 70 ºC) as que

proporcionaram as frações mais ricas em carboidratos, sendo 90% e 86,2% respectivamente, em relação a 100 g da fração deslipidificada.

**TABELA 11** - TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS, PROTEÍNAS TOTAIS, COMPOSTOS FENÓLICOS E GRUPAMENTOS ACETIL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*

| Frações | CHO total[a] | Proteína total[b] | Compostos fenólicos[c] | Grupamento acetil[d] |
|---|---|---|---|---|
| **W-1** | 63,8±0,9 | 1,8±0,9 | 0,5±0,02 | 17,9±1,6 |
| **W-2** | 55,7±3,5 | 1,1±3,4 | 0,4±0,03 | 20,1±0,4 |
| **W-3** | 51,9±2,3 | 2,8±2,3 | 0,4±0,07 | 23,3±1,7 |
| **W-4** | 55,5±4,7 | 4,5±4,7 | 0,5±0,04 | 13,1±2,7 |
| **HW** | 66,0±1,3 | 4,1±1,3 | 0,4±0,06 | 16,7±1,5 |
| **0.1Ca** | 52,9±3,4 | 2,8±3,4 | 0,3±0,04 | 18,8±0,4 |
| **0.1Ca(2)** | 70,9±1,5 | 1,1±1,5 | 0,2±0.02 | 22,4±0,3 |
| **1Ca** | 50,8±1,6 | 2,5±1,6 | 0,2±0,05 | 16,1±0,2 |
| **1Ca(2)** | 47,3±2 | 0,9±2,0 | 0,2±0,12 | 15,7±0,4 |

FONTE: O autor
NOTA: Dados apresentados em percentagem (% ± desvio padrão); [a] - Determinação colorimétrica de carboidrato total, segundo o método descrito por Fox e Robyt (1991), utilizando curva padrão de galactose ($R^2$ - 0,9855); [b] - Determinação colorimétrica de proteína total, segundo o método adaptado de Bradford (1978), utilizando curva padrão de albumina (10 a 1000 µg/mL, $R^2$ - 0,98); [c] - Determinação colorimétrica do teor de compostos fenólicos, segundo o método adaptado de Singleton e Rossi (1965), utilizando curva padrão de ácido gálico (10 a 1000 µg/mL, $R^2$ - 0,9987); [d] - Determinação colorimétrica de grupamentos acetil segundo o método de Hestrin (1946), utilizando curva padrão de glucose-5-acetato (0,1 a 0,8 µg/mL, $R^2$ - 0,9902).

As frações obtidas dos frutos de *A. esculentus* apresentaram em média 2,4% de proteínas totais, segundo o método adaptado de Bradford (1976). As frações W-4 e HW, foram as que apresentaram maior conteúdo de proteínas, sendo 4,5% e 4% respectivamente. As demais frações apresentaram valores abaixo de 3% (TABELA 11). Este valor pode ser considerado baixo, porém característico para frações ricas em polissacarídeos.

Sengkhamparn *et al*. (2009b), também relatam a presença de proteínas nas frações polissacarídicas obtidas dos frutos de *A. esculentus*, onde, mesmo após os tratamento para remoção de componentes de baixa massa molecular, com solução etanólica (70%), e solução de clorofórmio:metanol (v/v, 1:1), resíduo gerado apresentou um teor de 15,8% de proteínas. Bhat e Tharanathan (1986) obtiveram

um teor de 1,6% de proteínas, porém a fração foi obtida através da extração com ácido clorídrico (0,1M, 4 ºC, 6-8 h) dos frutos de *A. esculentus*, mesmo método utilizado por Amin (1956), porém a extração foi realizada durante 24 h (HCl, 0,1N) e gerou uma fração com teor de 3% de proteínas.

Lengsfeld e colaboradores (2004), estudaram uma fração obtida através da extração aquosa dos frutos de *A. esculentus*, porém, diferente do presente trabalho, esta foi precipitada com solução etanólica a 45% (v/v). Esta amostra apresentou conteúdo de 11,9% de proteínas e os autores relatam que mesmo após o tratamento com enzimas proteolíticas *(Pronase E)*, a análise em SDS-PAGE (8%) e coloração de prata (*silver-staining*) revelaram bandas com pesos moleculares entre 70 e 40 kDa, além de duas grandes faixas de cor marrom  em 37 e 25 kDa. Semelhante, a fração da mucilagem bruta obtida através da extração aquosa dos frutos de *A. esculentus* por El-Mahdy e El-Sebaiy (1984) apresentou 6,8% de proteínas. Estes autores sugerem que estas proteínas estão associadas aos polissacarídeos, pois mesmo após tratamento com ácido tricloroacético (5%) a fração ainda apresentou teor de proteínas de 3,97%, a qual é semelhante ao apresentado no presente estudo.

A dosagem do teor de compostos fenólicos, demonstrada na TABELA 11, foi realizada pelo microensaio utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu* descrito por Singleton e Rossi (1965). As frações apresentaram em média 0,32% de compostos fenólicos. Resultados estes que corroboram com os descritos por Khomsug e colaboradores (2010), que mesmo através das extrações com solventes apolares, como hexano e metanol, a polpa dos frutos de *A. esculentus* apresentaram baixos teores de compostos fenólicos. Woolfe, Chaplid e Otchere (1977) demonstraram que a fração polissacarídica obtida da extração aquosa da mucilagem bruta destes frutos não apresentou teores de polifenóis através da análise do ensaio com peróxido de hidrogênio 1% (30 ºC, 4 h).

As frações obtidas no presente trabalho apresentaram em média 18,25% de grupamentos acetil, segundo o método descrito por Hestrin (1949). demonstrado na TABELA 11, Vários estudos relatam a presença tanto de grupamentos acetil quanto metil esterificados nos compostos presentes na mucilagem dos frutos de *A. esculentus*, entretanto, há uma grande divergência em questão aos valores mensurados. Tomoda *et al.* (1980), através da espectroscopia de infravermelho da amostra obtida da extração aquosa à temperatura ambiente dos frutos de *A.*

*esculentus*, encontraram bandas de absorção de éster em 1250 e 1730 $cm^{-1}$. Estes autores ainda realizaram análise em cromatografia gasosa-líquida (GLC) e encontraram um pico com o tempo de retenção característico para ácido acético. Através desse resultado realizaram o cálculo do conteúdo de acetil e o resultado obtido foi de 5,5%. Sengkhamparn *et al*. (2009a), obtiveram, através da extração com solução tamponante (acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, 70 ºC) uma fração polissacarídica com grau de acetilação alto (DA = 58%), entretanto o método de quantificação utilizado pelos autores foi diferente. Estas amostras foram analisadas, em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após a reação de saponificação, com hidróxido de sódio (0,4 M) em isopropanol: água (50:50, v/v). E o cálculo foi realizado como mol de ácidos acéticos por 100 mol de ácido galacturônico.

### 6.2.2 Determinação da composição monossacarídica

Os resultados obtidos pela análise em cromatografia em camada delgada (CCDs) das amostras provenientes dos frutos de *A. esculentus* estão demonstrada na FIGURA 24. Todas as amostras apresentaram perfil semelhante, com a presença de Rha e traços Ara. Apesar da proximidade dos Rfs obtidos para Gal, Glc e Man, o perfil parece indicar a presença mais evidente de Gal. Como ácido urônico, foi verificada a presença GalA.

Alguns relatos da literatura, descrevem a presença de Gal, Glc, GlcN e Man, nas extrações aquosas realizadas nos frutos de *A. esculentus* (WHISTLER; CONRAD, 1954 a, b; AMIN, 1956; KELKAR; INGLE; BHIDE, 1962).

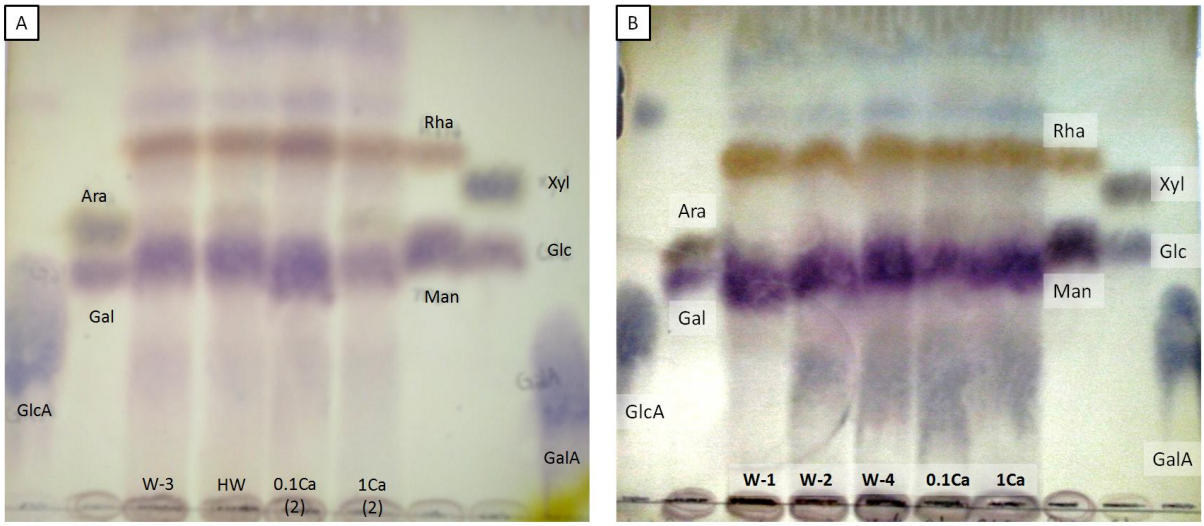



**FIGURA 24** - PERFIL MONOSSACARÍDICO OBTIDO EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O autor
NOTA: As amostras testadas foram previamente hidrolisadas com TFA 2,5 M, durante 8 h a 100 ºC. Como fase móvel foi utilizada a solução de acetato de etila:*n*-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1, v/v) e a revelação foi realizada com solução de orcinol sulfúrico (5%, m/v) e aquecimento a 100 ºC. **A** - Perfil monossacarídico obtido das frações W-3, HW, 0.1Ca(2) e 1Ca(2). **B** - Perfil monossacarídico obtido das frações W-1, W-2, W-4, 0,1Ca e 1Ca.

Além da análise em CCD, a composição monossacarídica neutra foi quantificada pela análise em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). E, em especial, a fração W-1 também foi analisada para a confirmação do ácido urônico, através cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada à detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).

A análise de GC-MS de todas as amostras obtidas, demonstrada na TABELA 12, confirmou a presença de quantidades significativas de Rha (média 10,3%) sendo que a fração da extração aquosa a quente (HW) foi a que apresentou a maior percentagem deste monossacarídico, em torno de 17%. A quantidade Ara ficou em torno de 2,3% e as frações W-3, W-4, HW e 1Ca apresentaram traços de Xyl. Em relação as hexoses (Glc, Man e Gal) todas as amostras apresentaram, como monossacarídeo neutro majoritário, a Gal. A fração extraída com ácido cítrico (0,1%, v/v, 60 ºC) foi a que apresentou maior quantidade deste monômero. Em relação à Glc, todas as amostras, exceto a 0.1Ca, apresentaram este monossacarídeo (em média 4%) e as frações W-1, W-2, W-4 e HW, apresentaram traços de Man.

**TABELA 12** - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE *A. esculentus*

| | Composição monossacarídica neutra* (%) | | | | | | | Ácidos* urônicos (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Rha | Fuc | Ara | Xyl | Man | Gal | Glc | |
| **W-1** | 8 | - | tr | - | 1 | 35 | 7 | 48±1,4 |
| **W-2** | 11 | - | 1 | - | 1 | 29 | 6 | 53±3,5 |
| **W-3** | 8 | - | 2 | 1 | - | 20 | 5 | 64±3,9 |
| **W-4** | 9 | - | 1 | tr | 1 | 25 | 6 | 58±1 |
| **HW** | 17 | - | 3 | 1 | 3 | 23 | 3 | 49±3,9 |
| **0.1Ca** | 13 | - | 6 | - | - | 20 | - | 61±3,1 |
| **0.1Ca(2)** | 5 | - | 1 | - | - | 42 | 3 | 49±1,9 |
| **1Ca** | 11 | - | 2 | 1 | - | 16 | 3 | 67±0,5 |
| **1Ca(2)** | 10 | - | 3 | - | - | 11 | 2 | 74±3,1 |

FONTE: O autor
NOTA: Dados apresentados em percentagem (% V±VDP). A composição monossacarídica neutra, foi analisada em GC-MS, na forma de acetatos de alditóis; O teor de ácidos urônicos totais, foi determinado pelo microensaio adaptado de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), e a percentagem foi calculada de acordo com uma curva padrão de ácido D-glucurônico.
**(*)** - Valores calculados em relação à percentagem de carboidrato total; **tr** - traços (<0,5%); **(-)** - não encontrado.

Todas as frações obtidas apresentaram grandes quantidades de ácido urônico, através da técnica colorimétrica descrita por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). O resultado obtido é consistente e característico das pectinas (MOHNEN, 2008; CAFFALL; MOHNEN, 2009; OVODOV, 2009), deste modo, sugerindo que todas as frações obtidas sejam polissacarídeos pécticos, em especial compostos por RG-I acetiladas.

Pela qualificação, demonstrado pela CCD e confirmação, por HPAEC-PAD, a fração W-1 apresenta, como ácido urônico o GalA (28,394 min). Entretanto, como pode ser observado na FIGURA 25, há a presença de um pico no tempo de eluição semelhante ao do GlcA. O tempo de eluição obtido por este pico (29,394 min), não coincidiu exatamente com o tempo de eluição de obtido pelo padrão de GlcA, desta forma, este não foi reconhecido e considerado como GlcA. Sugere-se então, que este pico possa estar relacionado ao GalA metil esterificado. Todavia, há a necessidade de realizar novas análises em HPAEC-PAD para confirmação desta hipótese. De acordo com a literatura, o ácido urônico presente nas frações obtidas da mucilagem dos frutos de *A. esculentus*, é o GalA (WHISTLER; CONRAD, 1954a,

b; WOOLFE; CHAPLID; OTCHERE, 1977; TOMODA *et al.,* 1980) Entretanto, Lengsfeld *e colaboradores* (2004), analisaram frações obtidas através da extração aquosa (25 ºC) dos frutos de *A. esculentus* em HPAEC-PAD (TFA 2 N, 121 ºC, 1 h) e todas estas frações apresentaram tanto GalA como GlcA.

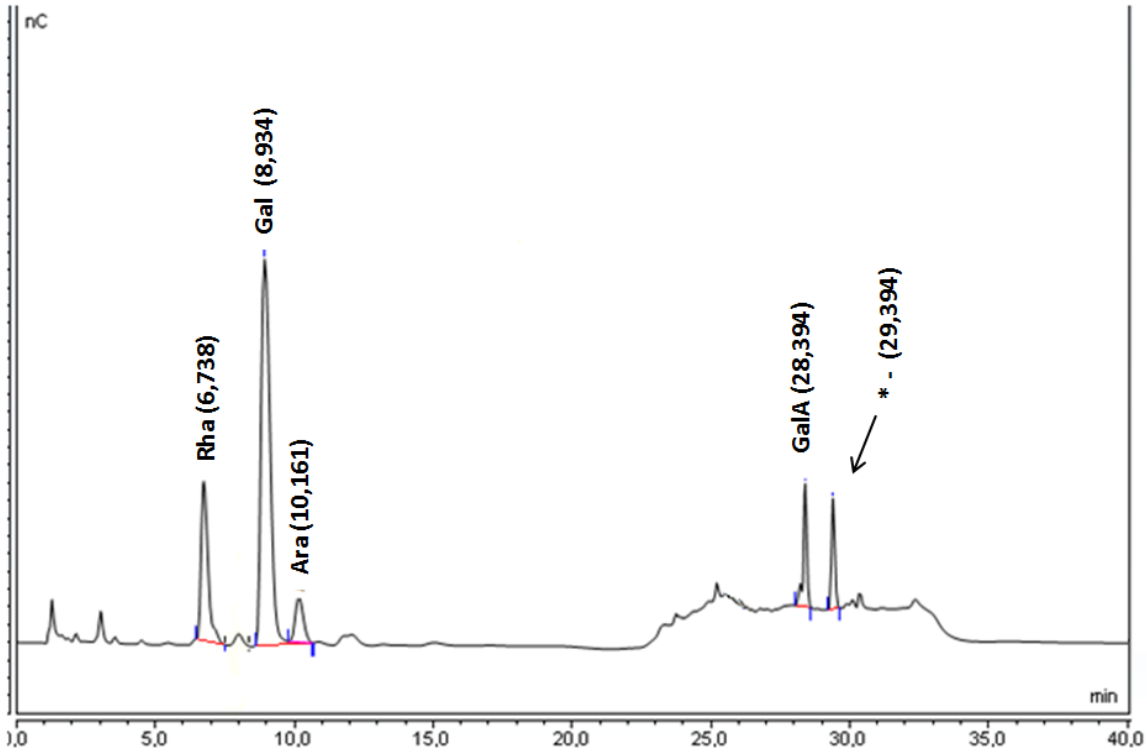



**FIGURA 25** - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À DETECTOR DE PULSO AMPEROMÉTRICO
FONTE: O autor.
NOTA: O perfil de eluição realizado através a hidrólise total (TFA 2 M, 120 ºC, 2 h). (*****) - Perfil sugerido para ser GalA metil esterificada.

A proporção obtida dos monossacarídeos, provavelmente pode estar relacionado com as metodologias utilizadas para a análise em GC-MS (5 h, 100 ºC, estufa) e HPAEC-PAD (2 h, 120 ºC, autoclave). Sugere-se que a hidrólise ácida realizada para ambas as análise, primeiramente destacou os monossacarídeos presentes nas cadeias laterais e não foi suficiente para isolar completamente os monossacarídeos presentes na cadeia principal, isso pode explicar o fato da alta proporção de Gal e da, relativamente, baixa de Rha.

Whistler e Conrad (1954a, b) realizaram uma das primeiras caracterizações dos polissacarídeos dos frutos de *A. esculentus*, e relataram que a mucilagem era composta por moléculas ácidas constituídas de Gal, Rha e GalA, resultados

similares foram obtidos por Tomoda *et al*. (1980). Amin (1956) relatou, que através da extração aquosa, o polímero obtido era composto Gal, Ara, Rha e GalA, com uma proporção de 80:3:10:6. No estudo posterior, desenvolvido por Woolfe, Chaplid e Otchere, a mucilagem obtida através da extração aquosa, era composta somente por Gal, Rha e Glc, na proporção de 1:0,12:0,10.

Estudos mais recentes, como o apresentado por Deters e colaboradores (2005), demonstram que, através da extração aquosa dos frutos, o polissacarídeo obtido era composto por Gal, Ara, Rha, Xyl, Man e Glc, porém a proporção obtida foi de 18:2:30:1:1:4 (DETERS; LENGSFELD; HENSEL, 2005), diferente do obtida no presente estudo, onde Gal é o composto em maior concentração, tanto nas extrações aquosas (25 ºC, quente), como com ácido cítrico (0,1% ou 1%, 60 ºC ou banho-fervente).

Sengkhamparn *et al*. (2009a), utilizando extrações com solução tampão (acetato de sódio 0,05 M) à quente (70 ºC), obtiveram um polímero, com composição semelhante à descrita por Whistler e Conrad (1954a, b), rico em Gal, Rha e GalA, na proporção molar de 1,3:1:1,3. Em comparação com estes resultados, e o que é sabido da literatura, uma fração péctica geralmente apresenta estruturas complexas com mais de um tipo de polissacarídeo (BEMILLER, 2008).

### 6.2.3 Dosagem de arabinogalactanas-proteínas

A difusão radial em gel de agarose contendo o Yariv β-glucosil [1,3,5-tri(*p*-glicosiloxifenilazo)-2,4,6-trihidroxibenzeno (β-GlcY), foi utilizada para a quantificação de AGPs presente nas frações vegetais obtidas dos frutos de *A. esculentus*. Na FIGURA 26 pode ser observada a reação positiva, pela presença do halo característico da precipitação das AGPs pela ligação ao β-GlcY. As frações apresentam cerca de 1% de AGPs, calculado em relação ao conteúdo de carboidrato total. A extração com ácido cítrico a 1% (m/v), foi o método que proporcionou a maior quantidade de AGPs, sendo de 1,67% para a fração 1Ca (60 ºC, 1 h) e 1,79% para a fração 1Ca(2) (banho-fervente, 1 h) (TABELA 13).

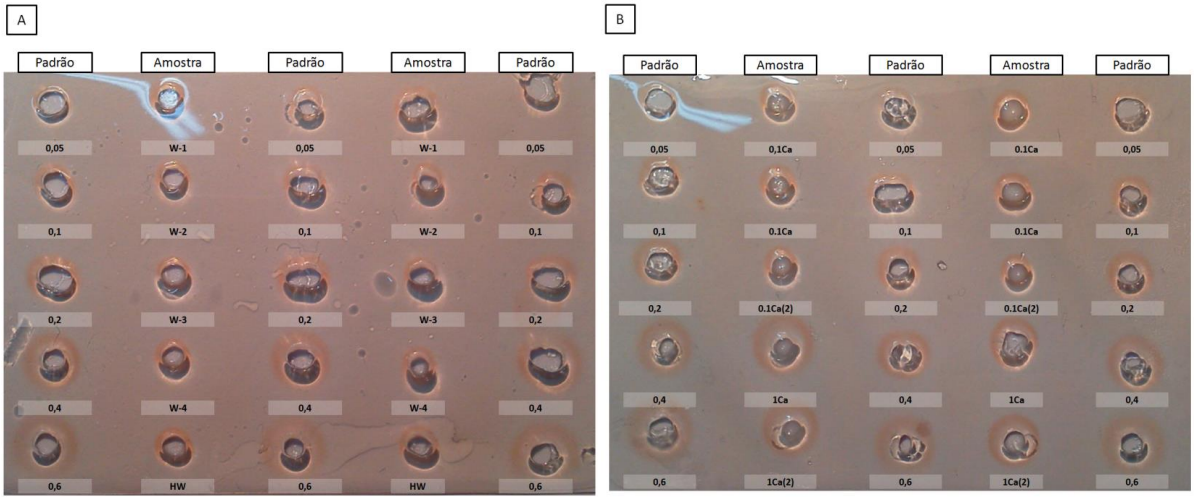



**FIGURA 26** - GEL DE AGAROSE COM O REAGENTE β-GlcY PARA DETECÇÃO DE AGPs DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O autor
NOTA: Método descrito por Van Holst e Clarke (1985); Padrão - Solução de goma arábica nas concentrações de 0,05 a 0,6 mg/mL; Amostras - concentração de 10 mg/mL;
**A** - Placa de gel agarose contendo as frações obtidas das extrações aquosas, **B** - Placa de gel agarose contendo as frações obtidas das extrações com ácido cítrico.

**TABELA 13** - CONTEÚDO DE AGPs PRESENTE NAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*

| Frações | AGP (%*) |
|---|---|
| **W-1** | 1,33 |
| **W-2** | 1,52 |
| **W-3** | 1,63 |
| **W-4** | 1,53 |
| **HW** | 1,28 |
| **0.1Ca** | 1,33 |
| **0.1Ca(2)** | 1,19 |
| **1Ca** | 1,67 |
| **1Ca(2)** | 1,79 |

NOTA: Conteúdo de AGPs mensurado de acordo com o método descrito por Van-Holst e Clarke (1985); **(*)** - Percentagem calculada em relação ao conteúdo de carboidrato total (FOX; ROBYT, 1991)

Sabe-se, que o β-GlcY (FIGURA 27) liga-se especificamente a porção AG, porém, a estrutura alvo a qual o β-GlcY reage na AGP ainda não foi elucidada (VAN HOLST; CLARKE,1985; LEE *et al*., 2005; ELLIS *et al.,* 2010). Kitazawa *et al.* (2013), demonstraram recentemente que a porção proteica não interfere nessa reação, pois mesmo com a degradação do *core* proteico da goma arábica, a parte do carboidrato ainda apresentou reatividade ao β-GlcY.

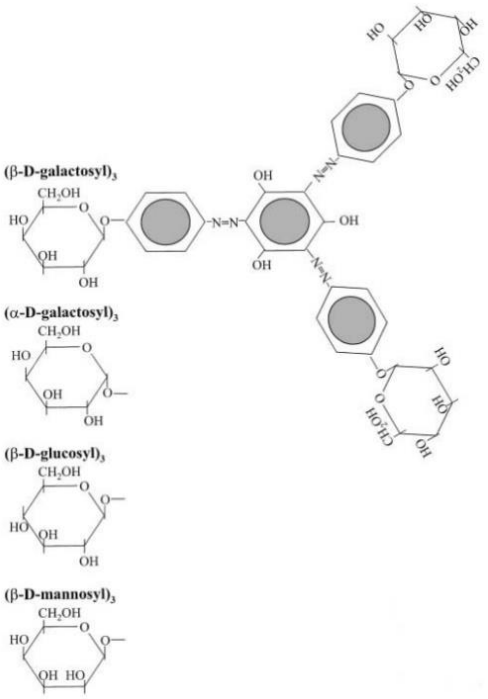



**FIGURA 27** - MODELO PROPOSTO PARA A ESTRUTURA DO β-GlcY
FONTE: SHOWALTER (2001)

AGPs são, geralmente, encontradas em membranas plasmáticas, paredes celulares e em secreções, como nos exsudatos.

Existem vários estudos que postulam a interação entre AGPs e pectinas. Baldwin, Maccann e Roberts (1993) propuseram que estas interações poderiam ser iônicas, mediadas pelo cálcio, entre as cadeias laterais do core proteico, carregadas positivamente e as moléculas carregadas negativamente nas pectinas. Este tipo de interação foi encontrado em cultura de células de cenoura, onde a AGP obtida, apresentou 11, de 14, unidades de aminoácidos carregados positivamente, e sugeriu que estes, poderiam estar conferindo as propriedades de ligação com as cargas negativas, dos grupos de ácidos urônicos, da pectina (BALDWIN; MCCANN; ROBERTS, 1993). Kwan e Morvan (1995) sugerem que as AGPs possam formar ligações covalentes com outros polímeros de parede celular, como o observado na interação entre AGs do tipo II e β-(1→4) xilanas, através de ligações do tipo éter. Immzerzeel (2005) sugeriu que este mesmo tipo de ligação covalente, poderia estar ocorrendo entre a AGs II da AGP com o GalA da pectina. Tan e colaboradores (2013) demonstraram que domínios de pectinas e arabinoxilanas obtidas em cultura celular de *Arabidopsis thaliana*, estão covalentemente ligadas às AGPs. Assim,

algumas AGPs podem estar servindo de agente de ligação cruzada da parede celular, para a formação de uma rede contínua entre polissacarídeos de parede celular e glicoproteínas estruturais.

As AGPs encontradas nas frações provenientes dos frutos de *A. esculentus,* poderiam estas associadas as moléculas de pectina, porém pelo baixo teor obtido, sugere-se que as AGPs mencionadas estariam dispersas no meio extracelular, e que foram extraídas juntamente com as frações pécticas em função de sua solubilidade em meios polares.

### 6.2.4 Análise de homogeneidade

Todas as amostras foram analisadas quanto a homogeneidade através da análise em cromatografia de exclusão estérica de alto desempenho com multidetecção (HPSEC-MALLS/RI). O detector de índice de refração (RI - *refractive index*) resulta em um sinal que é proporcional às concentrações presentes na amostra, ao passo que o sinal demonstrado pelo detector de *espalhamento de luz laser* em multiângulos (MALLS - *multi-angle laser light scattering*), é dependente da concentração, massa molar e raio de giros das espécies moleculares (VRIESMANN *et al*., 2011; CAMPESTRINI, 2013).

Todas as frações obtidas apresentaram um grande pico, demonstrado pelo MALLS, no ângulo de 90º e em torno de 30 a 50 min, de caráter polidisperso, indicando a presença de moléculas de altas massas moleculares, como pode ser observado nas FIGURAS 28, 29 e 30. Entretanto, nas frações W-1, W-2, W-3, HW, 0,1Ca e 0.1Ca(2), há a presença de um “ombro” no pico, a qual pode ser indicativo de agregações, o que é consistente com descrito na literatura. Osaku *et al.* (2002) e Fishman *et al.* (1993) relatam a agregação de pectinas e polissacarídeos neutros, através da análise em HPSEC-MALLS, e ainda sugerem que este processo pode ser indicativo da presença de subunidades complexas nas pectinas.

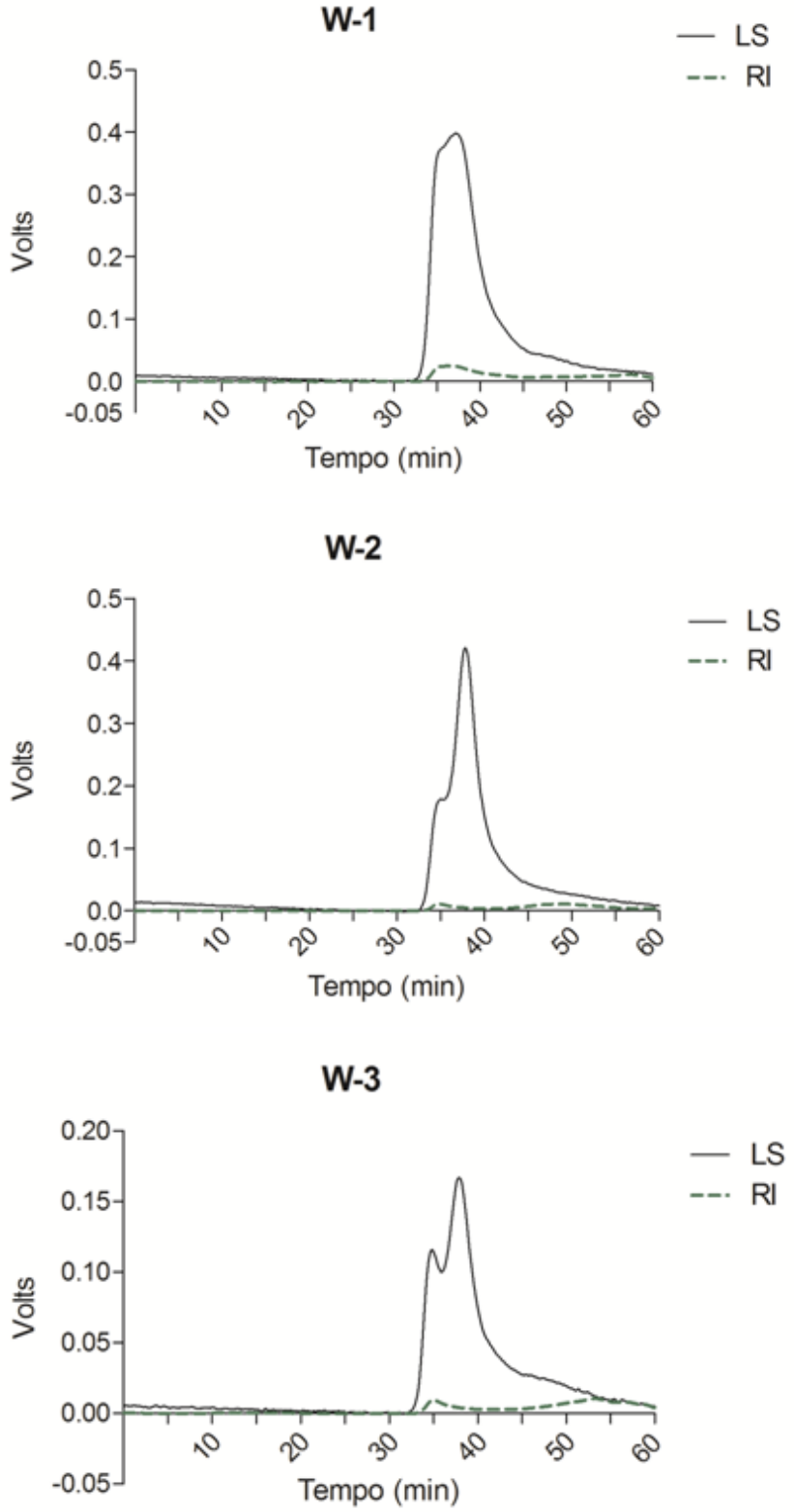



**FIGURA 28** - PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES W-1, W-2 E W-3 OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*.
FONTE: O autor
NOTA: As frações (1 mg/mL) foram solubilizada em nitrito de sódio 0,1 M contendo azida sódica 200 ppm. As amostras foram injeta em fluxo de 0,6 mL/min a 20 ºC e o cromatograma obtido foi analisado em *software* ASTRA (Wayatt Technology, Massachusetts - EUA).

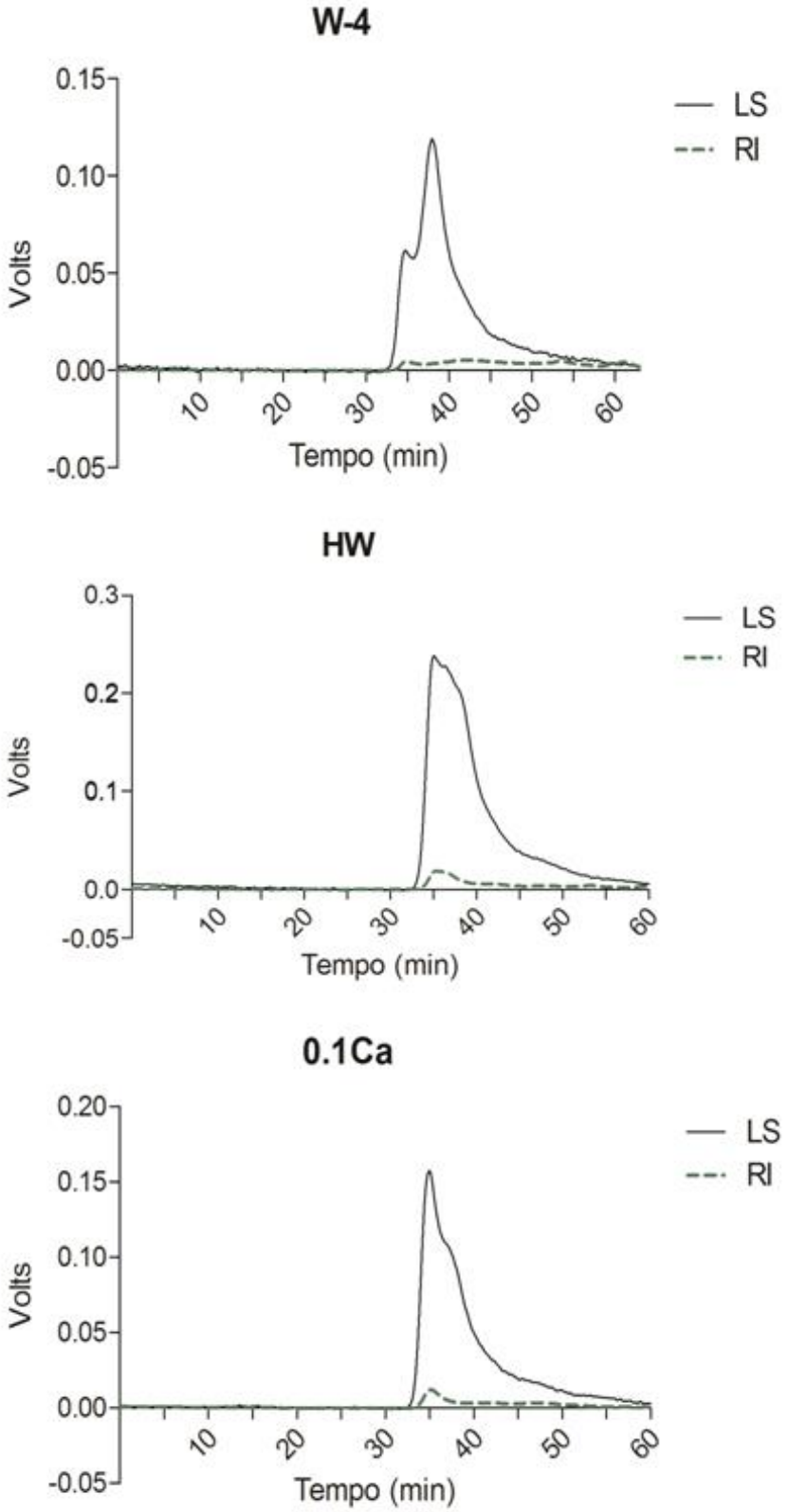



**FIGURA 29** - PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES W-4, HW E 0.1Ca OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*.
FONTE: O autor
NOTA: As frações (1 mg/mL) foram solubilizada em nitrito de sódio 0,1 M contendo azida sódica 200 ppm. As amostras foram injeta em fluxo de 0,6 mL/min a 20 ºC e o cromatograma obtido foi analisado em *software* ASTRA (Wayatt Technology, Massachusetts - EUA).

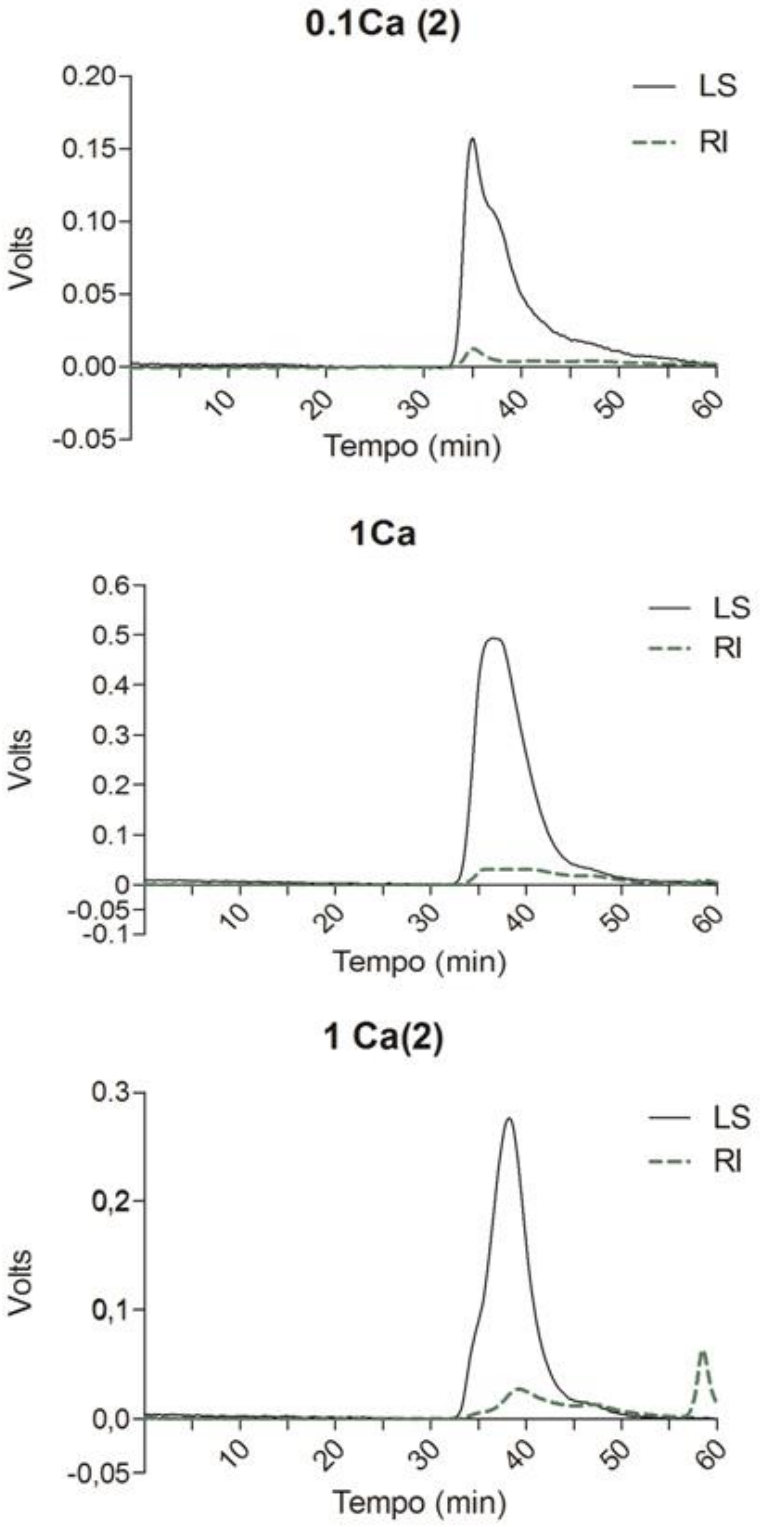



**FIGURA 30** - PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS/RI DAS FRAÇÕES 0.1Ca(2), 1Ca E 1Ca(2) OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*.
FONTE: O autor
NOTA: As frações (1 mg/mL) foram solubilizada em nitrito de sódio 0,1 M contendo azida sódica 200 ppm. As amostras foram injeta em fluxo de 0,6 mL/min a 20 ºC e o cromatograma obtido foi analisado em *software* ASTRA (Wayatt Technology, Massachusetts - EUA).

O perfil demonstrado pelo RI, nas frações W-1, HW, 0.1Ca e 0.1Ca(2), indica que estas frações estão compostas principalmente por polímeros de alta massa molecular (pico eluído entre 35 a 40 min). Em contrapartida, é observado nas fração W-2 a presença de dois picos, um mais definido em 35 min e outro, menos evidente, em torno de 45 e 50 min. Demonstrando que essa fração apresenta famílias moleculares com diferentes massas moleculares.

Da mesma forma, a fração W-3, apresentou dois picos, 35 e entre 50 e 60 min, que representam duas populações distintas de moléculas de alto massa molecular. O perfil apresentado pela fração W-4, demonstra uma população de moléculas, levemente evidenciada em torno de 35 min, e em proporção levemente menor, de vários compostos com concentrações similar e diferentes massas moleculares. A fração 1Ca, apresentou picos não resolvidos nos tempos de 35 a 50 min, enquanto a 1Ca(2), apresentou um pico entre os tempos de 35 e 45 min e outro, extremamente evidente em 60 min, que corresponde a moléculas de massa peso molecular.

As pectinas apresentadas pelas raízes tuberosas de *Beta vulgaris* (beterraba), também apresentaram perfil heterogêneo, bem como as presentes em frutos de *Rubus coreanus*, *Cordia abyssinica* (Laranja pegajosa/Cordia africana) e *Mangifera indica* (Manga) (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; MORRIS *et al*., 2010; BENHURA; CHIDEWE, 2011; HWANG; SHIN, 2011).

Pectinas puras são dificilmente obtidas de materiais vegetais, devido a sua natureza heterogênea, por, geralmente, apresentarem regiões lineares e cadeias laterais ramificadas, variações de interações inter e intramoleculares, além de diferentes padrões de distribuição de grupamentos metil-ésteres e *O*-acetil ao longo da cadeia poligalacturônica (VRIESMANN. 2008; SILA *et al*., 2009; MORRIS *et al.,* 2010).

O perfil heterogêneo, geralmente, é característico para soluções de macromoléculas, onde a mobilidade aleatória e difusa destas substâncias, provoca a formação de áreas de desiguais concentrações, desta forma gerando constantes dielétricas distintas, e, portanto, diferentes índices de refrações. Estas áreas reagem como centros de espalhamento de luz, quanto maior forem os centros, maiores serão as assimetrias na distribuição de intensidades de luz (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

### 6.2.5 Análises em espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier

A espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR) é uma técnica que caracteriza as propriedades vibracionais das moléculas em questão. Essa técnica pode ser usada para identificar o composto ou a composição da amostra. Isso é possível, uma vez que diferentes grupos funcionais absorvem diferentes frequências características de radiação na faixa do infravermelho. A medição é realizada através dos diferentes comportamentos vibracionais entre átomos, de acordo com suas ligações interatômicas (FERREIRA, 2008).

As fração W-1, W-2, W-3, W-4, HW, 0.1Ca, 0.1Ca(2) e 1Ca, apresentaram perfis semelhante. Todos os espectros das frações polissacarídicas obtidas dos frutos de *A. esculentus* estão demonstrados nas FIGURAS 31, 32 e 33.

Todas as frações, apresentaram uma banda entre 3600 e 2800 $cm^{-1}$, que corresponde a uma região típica de estiramento de ligações do tipo C-H ou O-H, além da presente entre 3000 e 2800 $cm^{-1}$, a qual é característica de estiramento de ligação C-H (FERREIRA, 2008; MONTEIRO, 2001).

A carboxila esterificada, apresenta pico máximo de absorção nas bandas de 1760 a 1720 $cm^{-1}$ (ISMAIL *et al*., 2012). O grupamento acetil *O*-ligado, geralmente, está associado com a banda da carboxila esterificada, entretanto, bandas adicionais em torno de 1250 ou 1455 $cm^{-1}$, também possam denotar este grupamento (THYGESEN *et al*., 2003; NEJATZADEH-BARANDOZI; ENFERADI, 2012).

As bandas entre 1650 e 1610 $cm^{-1}$ são características para as vibrações de estiramento assimétrico da carboxila livre (COOH), enquanto, a banda em torno de 1417 e/ou 1150 $cm^{-1}$ podem representam as vibrações de estiramento simétrico do $COO^{-}$. Estas regiões mencionadas, juntamente com a banda em torno de 1104 $cm^{-1}$, podem denotar os ácidos urônicos (HORI; SUGIYAMA, 2003; NEJATZADEH-BARANDOZI e ENFERADO, 2012).

As frações de W-1 a 1Ca, apresentam absorção máxima para a vibração da carboxila livre, que variaram entre as regiões de 1641 e 1620 $cm^{-1}$. Estas regiões estão em maior intensidade, indicando, que nestas amostras, a carboxila livre está em maior proporção. A fração 1Ca(2) apresentou perfil diferente, além do leve deslocamento das bandas das carboxilas livres e esterificadas, 1643 e 1737 $cm^{-1}$, a banda da carboxila esterificada, está em maior intensidade.

Kačuráková *et al.* (2000) relatam que bandas em aproximadamente 1143, 1148 e 1149 $cm^{-1}$ denotam ligações glicosídicas de unidades de Ara, Gal e Glc, respectivamente. As frações, obtidas dos frutos de *A. esculentus*, apresentaram uma banda que variou de 1147 a 1149 $cm^{-1}$, e considerando a composição monossacarídica das frações estudadas, é bem provável que estas, possam estar relacionadas com as cadeia laterais de galactanas ou arabinogalactanas. Os mesmos autores citados ainda relatam que bandas entre 1051 e 1039 $cm^{-1}$ possam estar relacionadas à ligação de unidades como Man, Ara e Rha.

Os componentes presentes na ligação glicosídica (C-O-C), também podem ser analisados. A região, entre 1200 a 900 $cm^{-1}$, é uma região característica para carboidratos, a chamada região de *finger print*. Ela é caracterizada pelas vibrações das ligações dos átomos no anel, a qual apresentam vibrações de alongamento das ligações entre C-OH dos grupos laterais sobrepostas com as vibrações da ligação glicosídica (C-O-C) (KAČURÁKOVÁ *et al.,* 2000). A distribuição especial α e β, geram picos diferentes na região do *finger print*, sendo a banda em torno de 830 a 850 $cm^{-1}$ para conformação *α* e a banda em torno de 890 $cm^{-1}$ para a conformação β (KAČURÁKOVÁ *et al.,* 2000). As frações de W-1 a 1Ca, demonstraram banda em torno de 890 $cm^{-1}$, sugerindo que os polissacarídeos apresentem, majoritariamente, as ligações em configuração β, enquanto a 1Ca(2), apresentou uma banda em torno de 831 $cm^{-1}$, que pode indicar ligações α.

Com a presença de β-arabinogalactanas, há o possível surgimento de duas bandas distintas, uma que pode variar de 1074 e 1078 $cm^{-1}$ e outra entre 1045 e 1043 $cm^{-1}$, estas bandas, representam a Gal*p* da cadeia principal e a Ara*f* presentes nas cadeias laterais, respectivamente (KAČURÁKOVÁ *et al*., 2000).

Não foi verificado bandas características de proteínas, que compreendem de 1500 a 1570 $cm^{-1}$ e 1607 a 1679 $cm^{-1}$, que são devido a vibrações de ligação N-H e estiramento C=O, respectivamente (SÉNÉ *et al*., 1994; FERREIRA, 2008).

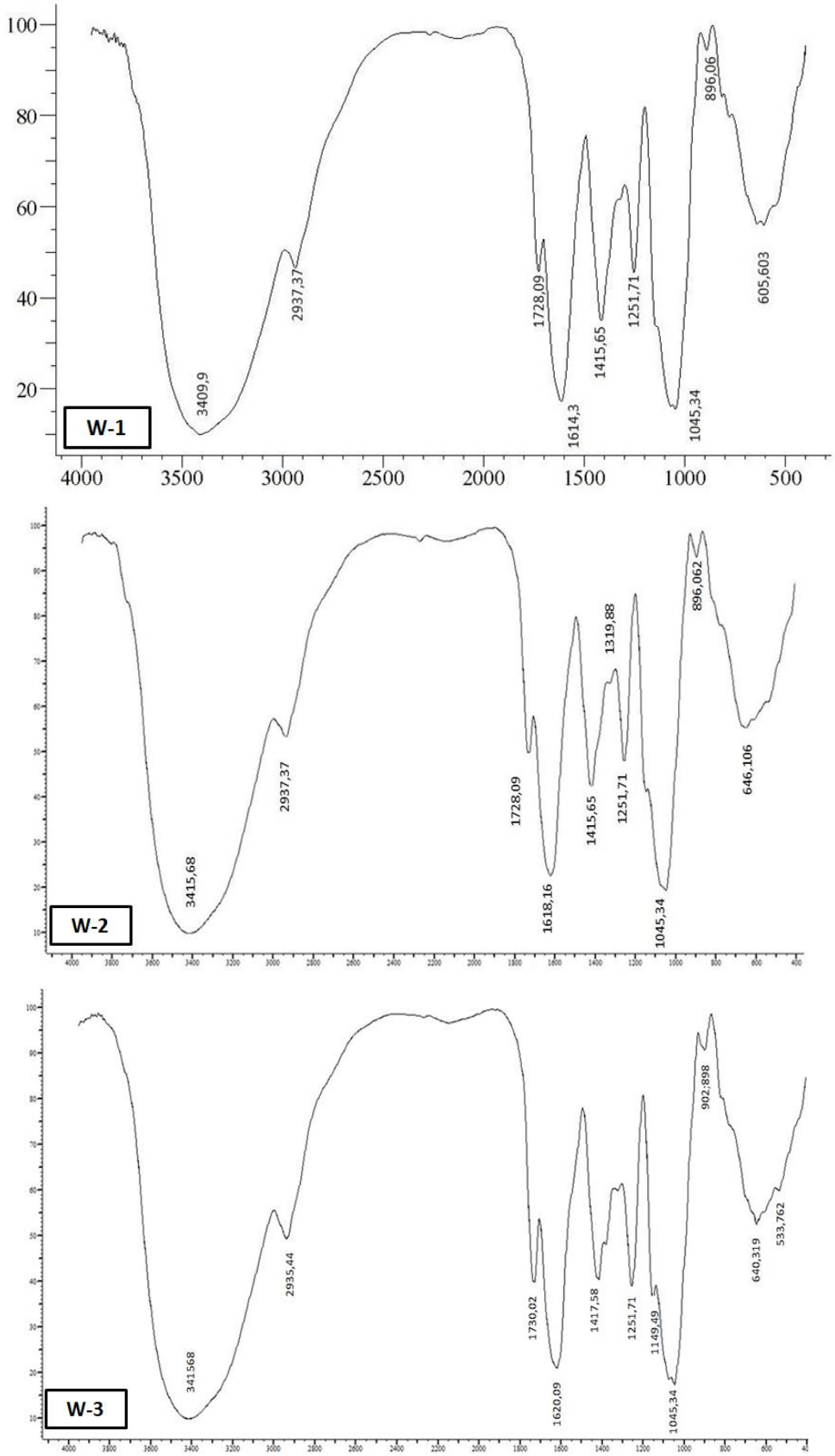



**FIGURA 31** - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES W-1, W-2 E W-3 OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O autor
NOTA: Amostras analisadas em pastilha de KBr.

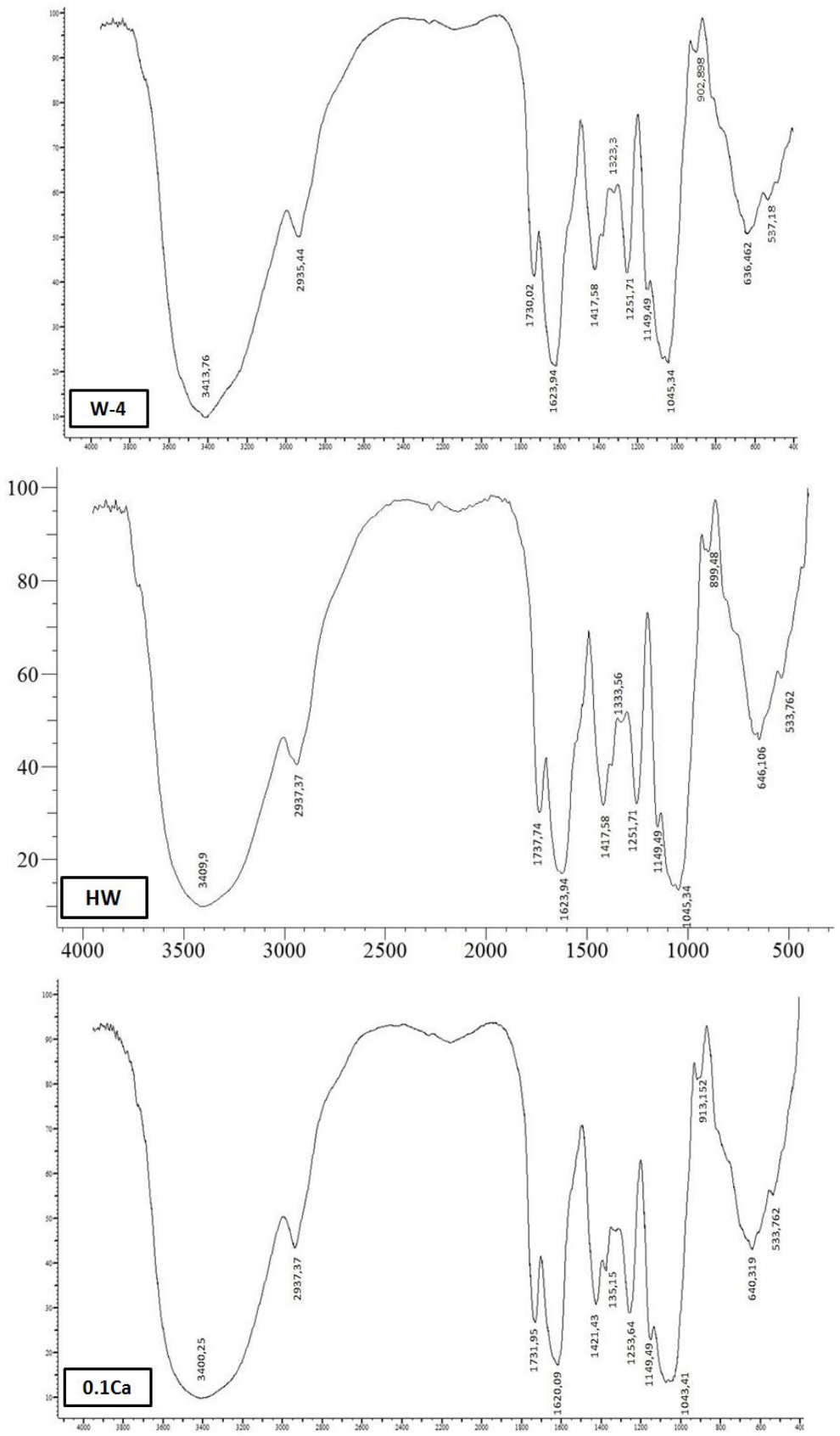



**FIGURA 32** - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES W-4, HW E 0.1Ca OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus.*
FONTE: O autor
NOTA: Amostras analisadas em pastilha de KBr.

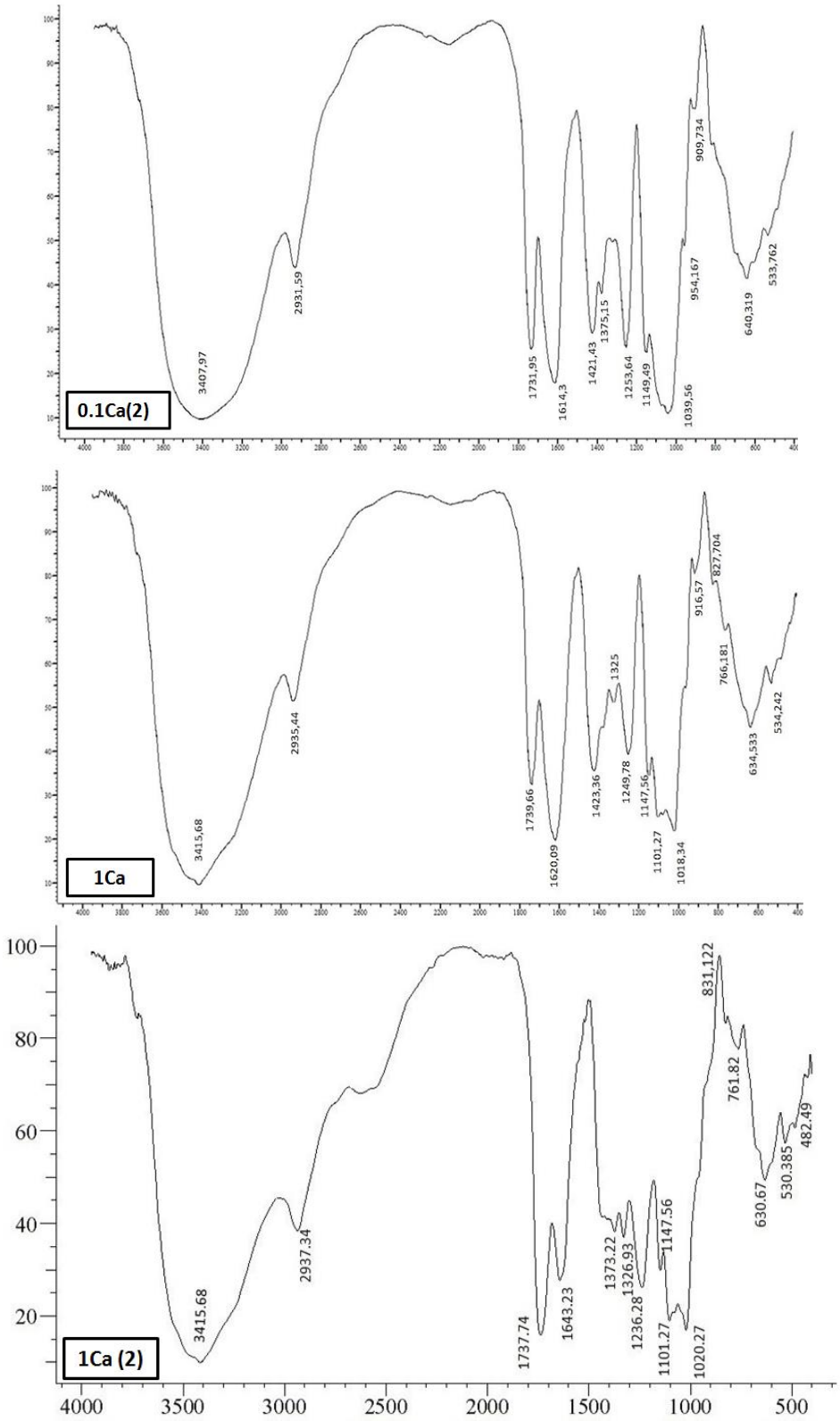



**FIGURA 33** - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES 0.1Ca(2), 1Ca E 1Ca(2) OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus.*
FONTE: O autor
NOTA: Amostras analisadas em pastilha de KBr.

### 6.2.6 Análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Monodimensional ($^{1}H$) e Bidimensional ($^{1}H/^{13}C$ - HSQC) da fração W-1

A fração W-1 foi submetida às análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear ($^{13}C$, $^{1}H$) com o objetivo de obter mais informações sobre características das estruturas química desta fração, como por exemplo, a configuração do carbono anomérico e tipos de unidades monossacarídicas. Os assinalamentos obtidos dos espectros da fração W-1 foram atribuídos considerando os dados de literatura juntamente com outras informações das análises químicas realizadas e discutidas anteriormente.

O espectro de $^{1}H$-RMN da fração W-1 (FIGURA 34) apresentou os vários assinalamentos na região de prótons anoméricos, em $\delta$ 5,81, 5,78, 5,33, 5,28, 5,26, 5,23, 5,20, 5,16, 5,12, 5,06, 5,01, 4,97, 4,58, 4,51, 4,48, 4,44, 4,36, 4,31, 4,22, 4,17 ppm. Unidades de H-1 de α-L-Ara*f* podem ser atribuídas ao assinalamento em 5,81 e 5,78 ppm (WINNING *et al*., 2007; SENGKHAMPARN *et al*., 2009b). A região de 5,23 a 5,03 podem ser atribuídos aos H-1 de unidades de $\alpha$-Rha*p*. O sinal em 4,97 ppm sugere-se a sobreposição dos sinais atribuídos aos H-1 de unidades de $\alpha$-GalA e/ou $\alpha$-Gal (WINNING *et al.,* 2007; SENGKHAMPARN *et al.,* 2009). O assinalamento em 4,49 ppm pode ser atribuídos as unidades de $\beta$-Gal (WINNING *et al*., 2007; SENGKHAMPARN *et al.,* 2009b). Assinalamentos em 2,11, 2,05 e 1,90 ppm podem ser atribuídos ao grupo acetil (WINNING *et al*., 2007; SENGKHAMPARN *et al*., 2009b). Além dos sinais referentes aos H-6 de α-L-Rha*p* que foram observados na região de 1,37 - 1,16 ppm (WINNING *et al*., 2007; SENGKHAMPARN *et al.,* 2009b).

Nos espectros de HSQC (espectroscopia de *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) (FIGURA 35) podem ser observadas as correlações para a região anomérica em 108,7/5,81 ppm são atribuídas a unidades α-L-Ara*f* (CHIDOUH; AOUADI; HEYRAUD, 2014). A correlação em 105,0/4,49 pode ser atribuída a unidades de $\beta$-Gal (WINNING *et al*., 2007). A correlação em 101,1/4,97 ppm pode ser atribuída às unidades de $\alpha$-Gal e $\alpha$-GalA (WINNING *et al*., 2007; SENGKHAMPARN *et al*., 2009b). A região que compreende as correlações de C-1/H-1 em 99,0/5,03; 99,5/5,07; 99,6/5,07; 99,6/5,12; 99,7/5,28; 99,8/5,23 e 100,2/5,23 podem ser atribuídas às unidades de $\alpha$-Rha*p*, em diferentes ambientes químicos (WINNING *et al*., 2007; SENGKHAMPARN *et al*., 2009b). De acordo com

Sengkhamparn *et al*. (2009b), as unidades de α-Rha*p* podem estar *O*-2, *O*-4 e *O*-2,4 ligadas, sendo estas, muitas vezes acetiladas em *O*-3.

Outras correlações em 78,7/4,45 e 78,6/3,97 podem ser atribuídas, respectivamente, ao C-4/H-4 de unidades substituídas de α-GalA e α-Rha. Além disso, o espectro mostra a presença da correlação das unidades metil-esterificadas (-O*C*$H_3$) em 58,9/3,64 ppm, (WINNING *et al*., 2007). As correlações em 18,3/1,33, 18,3/1,28, 18,3/1,25, 18,3/1,25, podem ser atribuídas aos grupamentos metílicos (C-6) das unidades de α-Rha (WINNING *et al*., 2007; SENGKHAMPARN *et al*., 2009b). A correlação em 22,0/2,11 pode ser atribuída ao grupamento acetil (SENGKHAMPARN *et al*., 2009b; CAMPESTRINI, 2013).

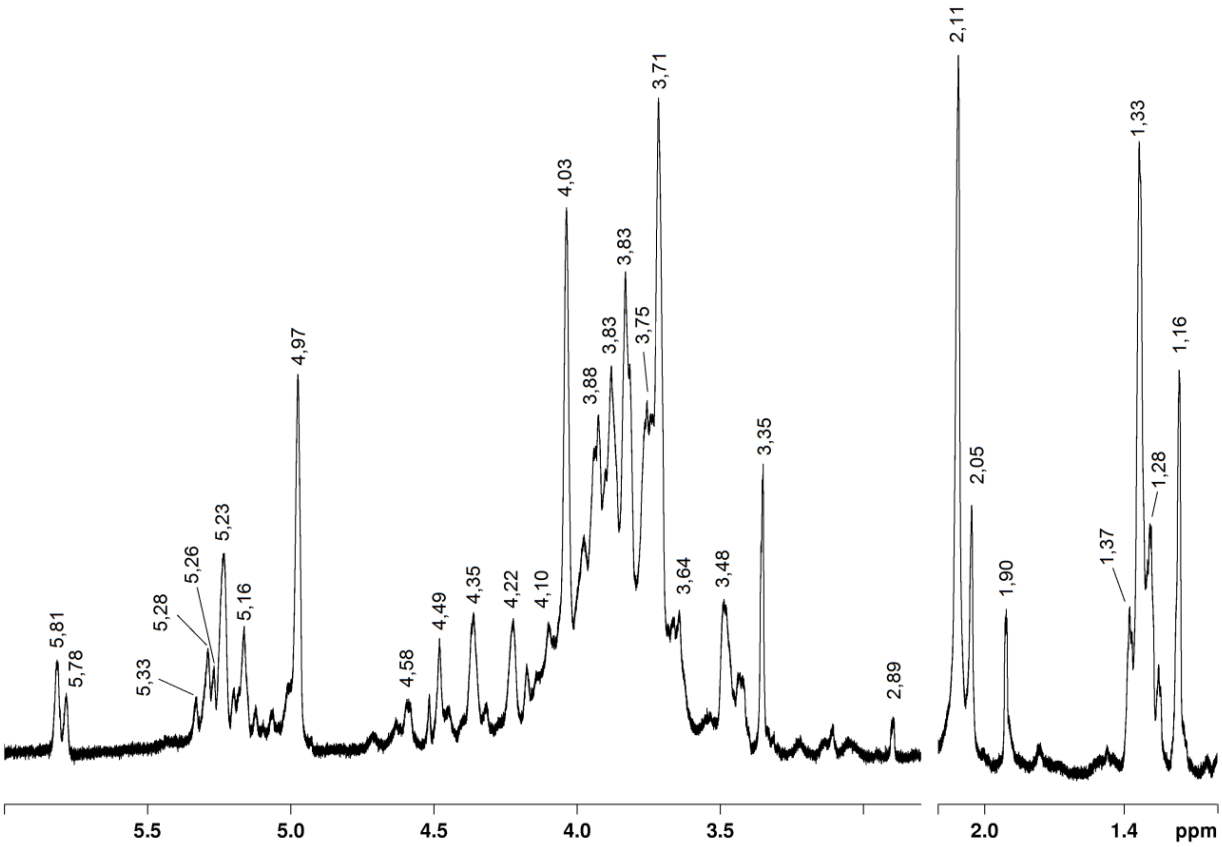



**FIGURA 34** - ESPECTROS DE $^1$H-RMN (400 MHz) DA FRAÇÃO W-1 OBTIDA DOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O autor
NOTA: Amostra solubilizada em $D_2O$ e analisada a 50 ºC.

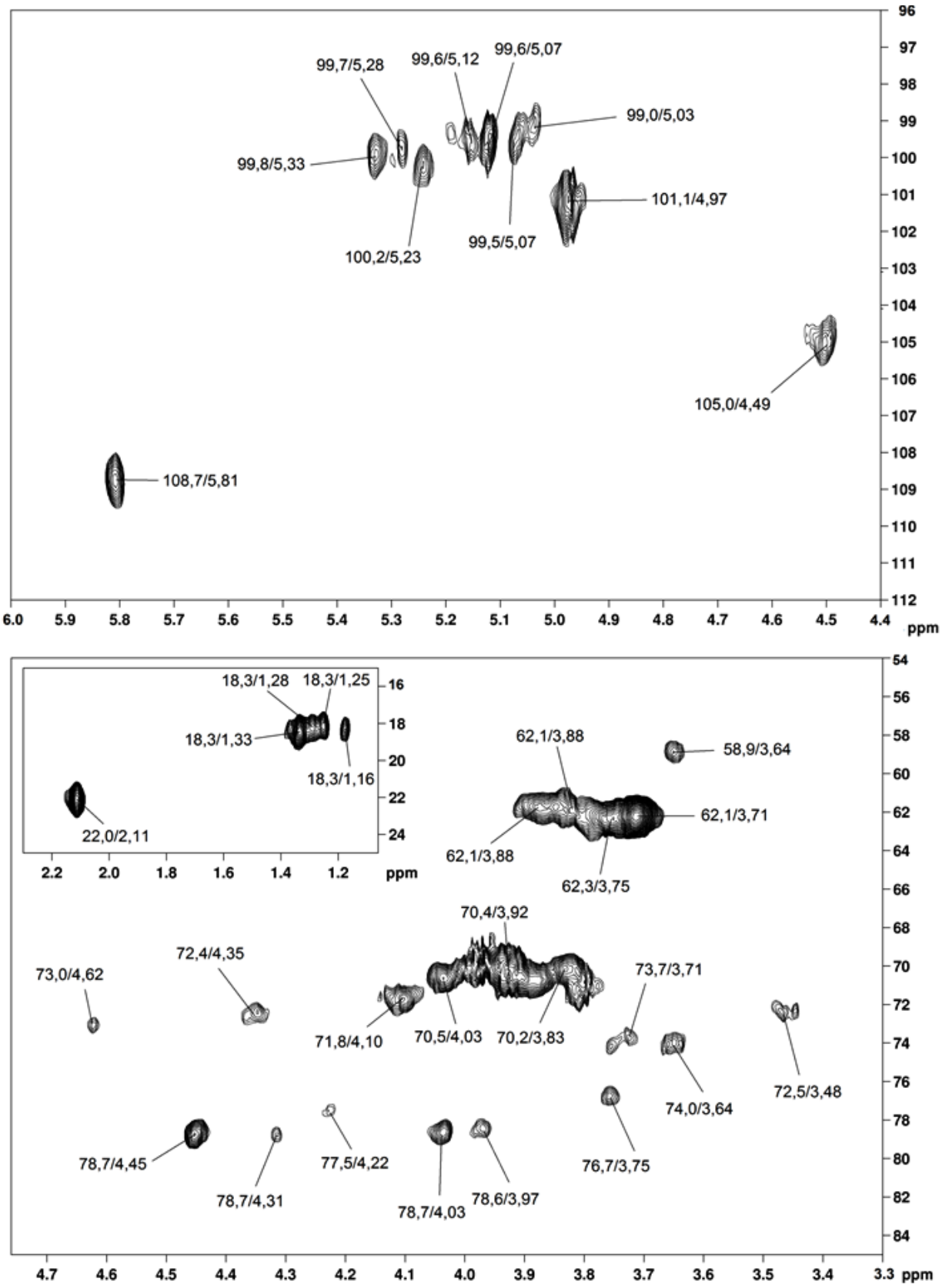



**FIGURA 35** - ESPECTROS DE CORRELAÇÃO ($^{13}C$, $^{1}H$) - HSQC DA FRAÇÃO W-1 OBTIDA DOS FRUTOS DE *A. esculentus*
FONTE: O autor
NOTA: Amostra solubilizada em $D_2O$ e analisada a 50 ºC.

Considerando as análises químicas realizadas e informações da literatura (SENGKHAMPARN *et al*., 2009b) sugere-se que a fração W-1 seja uma ramnogalacturonana tipo I acetilada, apresentando como cadeia principal uma estrutura contendo unidades alternantes de -2)-α-Rha-(1→4)-α-GalA-(1→2)-α-Rha-(1→4)-α-GalA-(1-. As unidades de Rha e GalA poderiam estar acetiladas em *O*-2 e *O*-3. Além disso, às unidades de Rha estariam substituídas por unidades de α-Gal as quais estariam ligada em *O*-4 formando as cadeias laterais. As unidades de Ara também fariam parte das cadeias laterais.

## 6.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro*

### 6.3.1 Avaliação da atividade imunomoduladora da fração W-1 obtida dos frutos de *A. esculentus*

Para a avaliação desta atividade, a fração de maior rendimento, W-1, foi selecionada para investigar os seguintes parâmetros: alterações morfológicas, viabilidade celular, retenção de lisossomos pelo método do vermelho neutro, indução da produção de óxido nítrico (NO•) e de citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α) sobre cultura de lavado peritoneal de camundongos Swiss, sem estímulo prévio

#### 6.3.1.1 Análises morfológicas

Para a atividade fagocítica, estas células se aderem a um substrato e modificam a sua morfologia celular, ganhando uma forma mais espraiada, para aumentar sua área de superfície de contato com a partícula a ser fagocitada (FURTADO *et al.,* 2014).

A fração W-1, em diferentes concentrações, foi analisadas quanto a sua capacidade de causar alterações morfológicas típicas de ativação em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss, após tratamento de 24 h. A morfologia dos macrófagos presentes no grupo controle, é caracterizada pela forma menos espraiada, como demonstrado na FIGURA 36 A. Quando estas células são

estimuladas, com o LPS por exemplo, ocorre o aparecimento de projeções citoplasmáticas, porém, o número de vacúolos é semelhante ao apresentado pelo controle (FIGURA 36 B).

A fração W-1, FIGURA 36 e 37 (C a J), proporcionou alterações morfológicas em todas as concentrações testadas. Os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss apresentaram, por observações em microscopia óptica, alterações típicas de ativação tais como: espraiamento, aumento das projeções citoplasmáticas e vacúolos citoplasmáticos. Os núcleos dos macrófagos, testados com as concentrações mais altas, está menos corado, o que pode indicar uma menor condensação do material genético, e possível aumento de atividade nuclear. Nestas concentrações, há também uma maior presença de vacúolos citoplasmáticos.

Nacife *et al.,* (2000; 2004) realizaram estudos com macrófagos estimulados intraperitonealmente, *in vivo*, durante 24 e 48 h, com solução de LPS (250 ng/mL) ou 300 µg/animal de carragenana comercial (CAR - λ tipo IV). Neste trabalho os resultados obtidos com o estímulo com LPS foram semelhantes aos apresentados no presente trabalho (LPS, 50 ng/mL). Os resultados gerados pela carragenana, demonstram o surgimento de vacúolos citoplasmáticos, sendo em maior quantidade quando comparados ao controle e ao grupo tratado com LPS e, é semelhante ao demonstrando pela fração W-1, em diferentes concentrações. Diferente, os polissacarídeos ácidos das raízes de *Panax ginseng* induziram a produção de NO• em camundongos *knockout* RGS2 (tipo-selvagem C57BL/6), porém sem a visível alteração da morfológica (BYEON *et al.,* 2012). Os autores sugerem que o mecanismo de ativação causado pelo LPS e o polissacarídeo ácido seria diferente da causada pela estimulação com o LPS. Esta modo de pensar poderia ser válido para o presente trabalho, pois a alteração morfológica induzida pelo LPS foi, relativamente, diferente a produzida pela fração W-1 em diferentes concentrações.

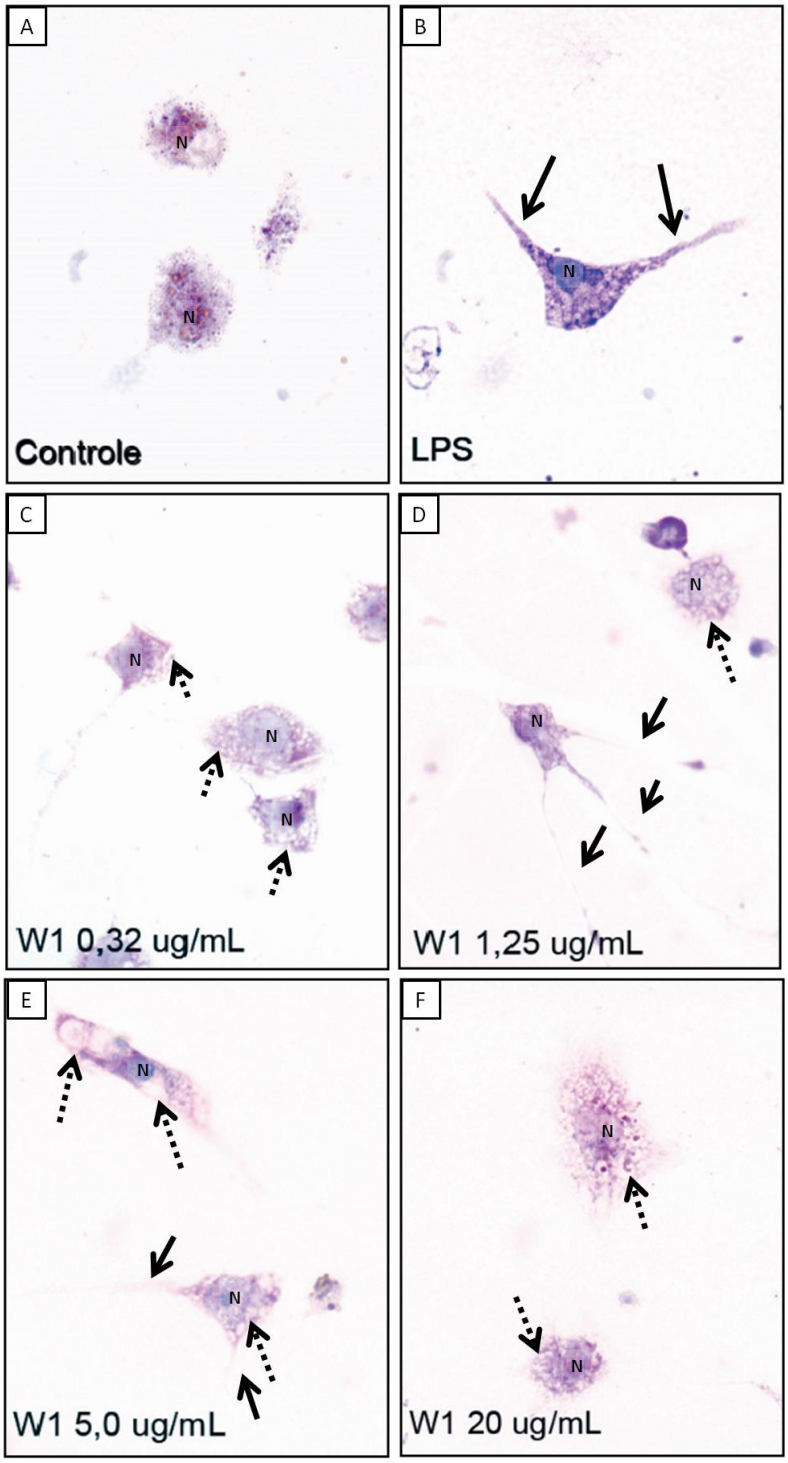



**FIGURA 36** - EFEITO DO TRATAMENTO DE 24 H COM A FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS SWISS

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24 h, em atmosfera de $CO_2$ a 37 ºC, na ausência e presença de diferentes concentrações da fração W-1. O LPS foi utilizado como controle positivo. As lamínulas foram fixadas com solução de Bouin e os macrófagos aderidos às lamínulas foram corados com HE, as fotomicrografias foram obtidas através de microscópico Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - Japão).

**Controle**: Células cultivadas somente com meio MEM suplementado; **LPS**: Células cultivadas com meio MEM suplementado e LPS (50 ng/mL); **Setas contínuas**: Projeções citoplasmáticas; **Setas pontilhadas**: Vacúolos; **N**: Núcleo.

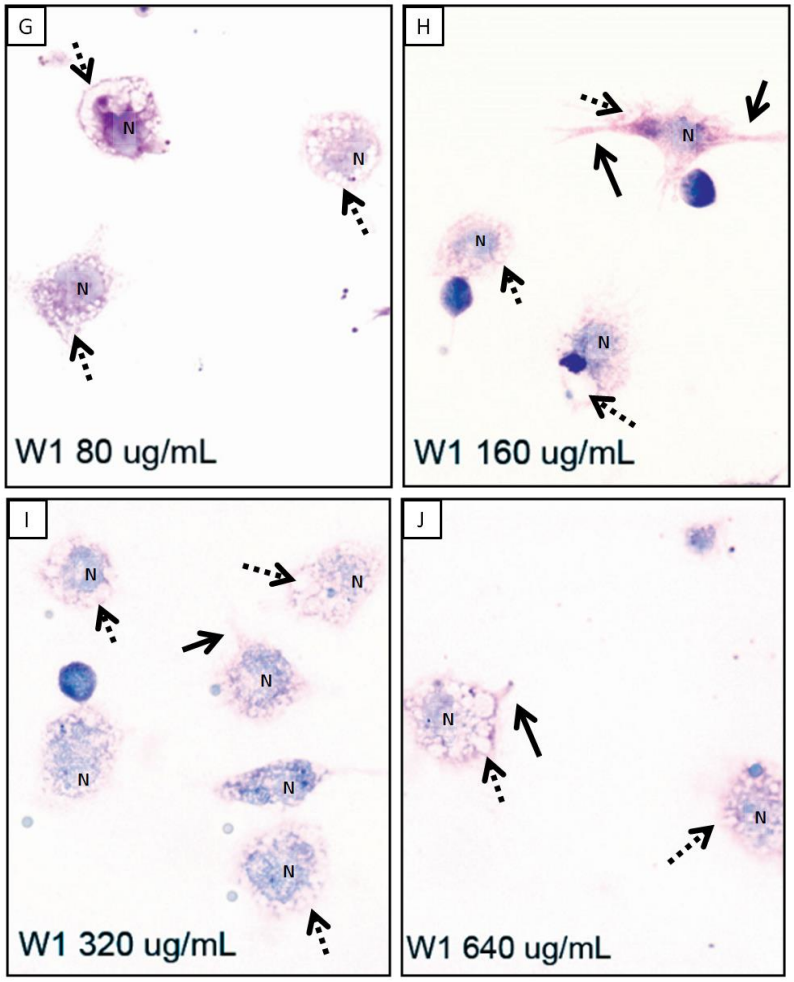



**FIGURA 37** - EFEITO DO TRATAMENTO DE 24 H COM A FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS SWISS
NOTA: Meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24 h, em atmosfera de $CO_2$ a 37 ºC, na ausência e presença de diferentes concentrações da fração W-1. O LPS foi utilizado como controle positivo. As lamínulas foram fixadas com solução de Bouin e os macrófagos aderidos às lamínulas foram corados com HE, as fotomicrografias foram obtidas através de microscópico Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - Japão).
**Controle**: Células cultivadas somente com meio MEM suplementado; **LPS**: Células cultivadas com meio MEM suplementado e LPS (50 ng/mL); **Setas contínuas**: Projeções citoplasmáticas; **Setas pontilhadas**: Vacúolos; **N**: Núcleo.

### 6.3.1.2 Efeito da fração W-1 sobre a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

A avaliação da viabilidade celular, foi realizada pela medida da alteração induzida pela fração W-1, sobre a atividade metabólica de células viáveis. Esse método baseia-se na redução dos sais tetrazólio, por meio de reação enzimática, catalisada pela succinato desidrogenase, que cliva o anel dos sais, convertendo a

formazan, de cor púrpura, a qual é detectado no comprimento de onda de 550 nm. Desta forma, a quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; MACIEL *et al*., 2002; KWON; HA, 2012).

Os resultados obtidos demonstram que nenhuma das concentrações testadas, diminuiu a viabilidade celular, como demonstrado na FIGURA 38. A concentração de 5 µg/mL no tempo de 24 h, apresentou absorbância maior que a encontrada pelo controle negativo. Este resultado sugere que esta concentração pode ter estimulado o metabolismo energético celular (MOSMANN, 1983), pois houve aumento da formação do cristal de formazan, em cerca de 85%.

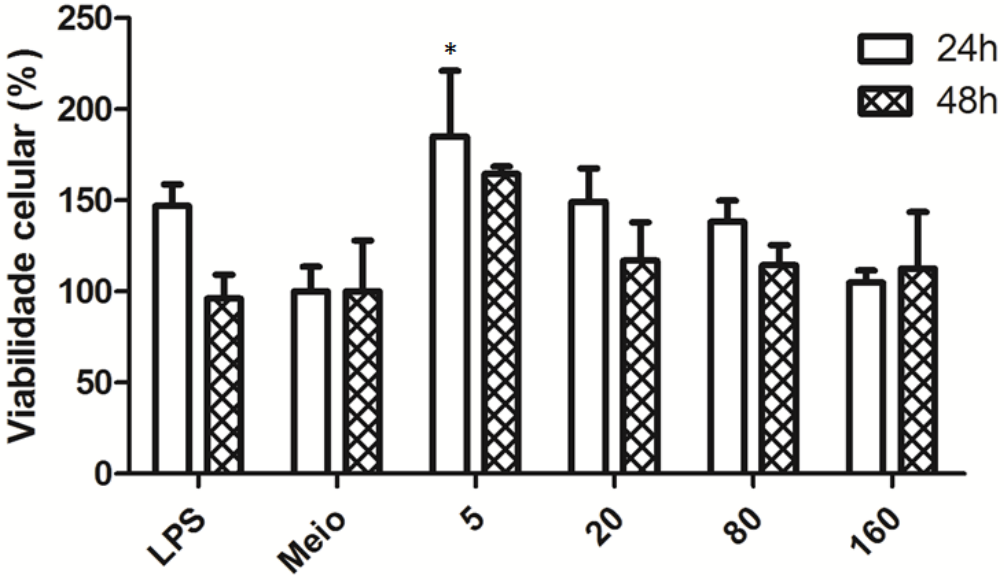



**FIGURA 38** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS TRATAMENTO DE 24 E 48 H SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados em períodos de 24 e 48 h em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37 ºC na ausência e na presença de diferentes concentrações da fração W-1. Após foi realizado o ensaio para verificação da viabilidade celular pelo método do MTT (REILLY *et al.,*1998).

**LPS** - 50 ng/mL**; Meio** - Controle negativo composto somente pelo meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino; Soluções da fração **W-1**, nas concentrações de 5, 20, 80 µg/mL; **(*)** - Diferença significativa em relação ao controle negativo segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Segundo Schepetkin e Quinn (2006), a maioria dos polissacarídeos derivados de plantas superiores são, relativamente, não tóxicos e não causam efeitos colaterais significativos. Estas características é de extrema importância, pois outras

moléculas imunomoduladoras, como as sintéticas e polissacarídeos bacterianos, podem apresentar efeitos citotóxicos.

Outros experimentos com frações polissacarídicas provenientes dos frutos de *A. esculentus* também demonstraram baixa citotoxicidade. Deters *et al.* (2005) isolaram, da mesma planta, um polímero rico em Rha e GalA, o qual também não foi citotóxico frente a cultura de queratinócitos humanos em cultura primária e ainda proporcionou a proliferação destas células, mesmo em baixas concentrações como de 10 μg/Ml (DETERS; LENGSFELD; HENSEL, 2005).

Frações polissacarídicas ácidas provenientes de hastes de *Opuntia polyacantha* e compostas de Gal, Xyl, Ara, Rha e GalA com proporções variando de 34-48:17-29:10-15:6-16:15-19*,* não alteraram a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J77A.1, mesmo nas dosagens mais altas (100 a 800 µg/mL) (SCHEPETKIN *et al*., 2008). Resultado semelhante, foi obtido pelas frações ácidas (200 a 1600 μg/mL), constituídas por Gal*p*, Ara*f*, Rha*p* e GalA*p* (35-48:13-18:2,1-3,5:22,8:39,2) das flores, de *Tanacetum vulgare* sobre a mesma linhagem celular mencionada (XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007)

O ARAGAL, polímero ácido obtido da goma de *Anadenanthera colubrina* e composto de Ara, Man, Gal, Rha e GlcA (na proporção de 63:1:20:6:10), também não apresentou caráter citotóxico em cultura primária de macrófagos peritoneais murinos (DELGOBO *et al.*, 1998; MORETÃO *et al.,* 2003).

Frações polissacarídicas neutras (0,3 a 1000 µg/mL), ricas em Man e Glc, obtidas de extrações aquosas de espécies do gênero *Dendrobium spp.* (*D. officinale*, *D. fimbriatum*, *D. nobile*, *D. chrysotoxum*, *D. huoshanense e D. officinale*) não apresentaram efeito citotóxico em tratamento de 24 h frente à linhagem de macrófagos RAW 264.7. As concentrações mais baixas testadas, 0,3 a 30 µg/mL, ainda promoveram a proliferação celular (MENG *et al.,* 2013).

#### 6.3.1.3 Efeito da fração W-1 sob a produção NO• em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

Quando expostos a certos estímulos, a células fagocíticas, como os macrófagos, apresentam um aumento na taxa do consumo de oxigênio, num processo chamado de *burst* respiratório. Porém, esse aumento no consumo não

está relacionado com a produção de energia, mas sim na geração de poderosos agentes microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio (BABIOR, 1984)

O NO• é produzido pelos macrófagos ativados por citocinas e/ou compostos microbianos. É gerado, através da reação enzimática da óxido nítrico sintase (NOS ou iNOS), que converte aminoácido L-arginina e oxigênio molecular no intermediário $N^{CO}$-hidroxi-L-arginina e posteriormente em citrulina e NO•. O NO• tem como função, de forma não específica, a defesa contra células tumorais e invasores patógenos (BOGDAN, 2001; XU *et al*., 2012).

O presente trabalho avaliou os efeitos causados pela fração W-1, em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss, sobre a produção de NO•. A FIGURA 39 demonstra o efeito desta fração, em diferentes concentrações, em ensaios de 48 h. As concentrações de 20, 80 e 160 µg/mL, aumentaram, em média, 53% a produção de NO• quando comparado o grupo controle. As concentrações de 5 e 80 µg/mL, foram as mais efetivas, com aumento de 92% e 90% respectivamente e, ambas, apresentaram maior atividade em relação àquela demonstrada pelo LPS (50 ng/mL), 71%.

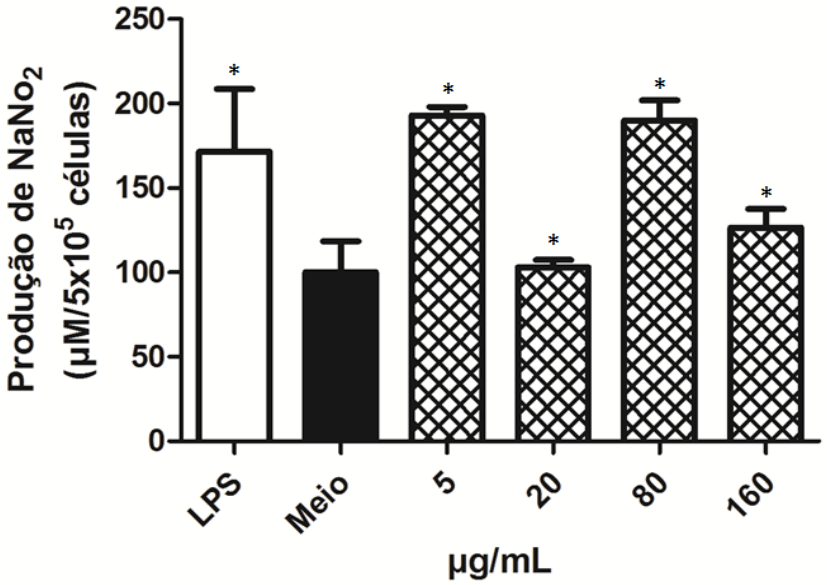



**FIGURA 39** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 48 H DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS
FONTE: O autor
NOTA: Meio MEM foi suplementando com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados, em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37 ºC, na ausência e presença de diferentes concentrações da fração W-1, durante 48 h. A produção de NO, foi realizada através da sua quantificação, na forma de nitrito ($NaNO_2$) no sobrenadante pelo método de Griess (GREEN *et al.,* 1982).
**LPS** - 50 ng/mL**; Meio** - Controle negativo composto somente pelo meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino; Soluções da fração **W-1**, nas concentrações de 5, 20, 80 µg/mL; **(*)** - Diferença significativa em relação ao controle negativo segundo o teste de Tukey (p≤0,05).

O polímero ácido, descrito anteriormente, dos frutos de *Opuntia polyacantha* também provocou aumento na produção de NO, *in vitro*, por macrófagos J77.4.A1, porém, de forma diferente do resultado obtido no presente trabalho, este aumento foi dose-dependente (SCHEPETKIN *et al.,* 2008). Outro polissacarídeo péctico, obtido de extrações aquosas, das partes aéreas *Biophytum petersianum*, composto por 45% de GalA e Rha:Gal:Ara:Xyl, na proporção de 9,8:10,5:15,6:10, induziu a liberação de NO, tanto por macrófagos derivados de monócitos de baço murino, como por macrófagos da linhagem celular R2, porém o efeito foi mais pronunciado nas células R2 (INNGJERDINGEN *et al.,* 2006, 2008).

Xie, Schepetkin e Quinn (2007) demonstraram que polissacarídeos ácidos (Gal*p*, Ara*f*, Rha*p* e GalA*p*, 35-48:13-18:2-1-3,5:22,8:39,2) obtidos das flores de *Tanacetum vulgare*, apresentam efeito imunomodulador, porém, após fracionamento, as frações obtidas apresentaram atividades diferentes sobre a produção de NO em J774.A1. A fração de alto massa molecular, rica em carboidrato e positiva para AG-II, demonstrou efeito dose-dependente, enquanto a fração rica em proteínas (40%) foi praticamente nula.

Compostos contendo AG, como as RG-I, são conhecidos por serem potentes imunomoduladores. Estudos postulam que as cadeias laterais de AG-II sejam os possíveis locais da atividade biológica em polissacarídeos pécticos (PAULSEN, 2001; INNGJERDINGEN *et al.,* 2008). Estudos com RG-II obtidas de *Glinus oppositifolius*, demonstraram que esta pectina não apresentou atividade sobre o sistema complemento humano, na proliferação de linfócitos B murinos e na ativação dos macrófagos da linhagem R2-MΦ. Estas moléculas geralmente apresentam outras atividades biológicas, como as RG-II obtidos das raízes de *Bupleurum falcatum*, que apresentaram atividade antiúlcera gástrica (HIRANO *et al.,* 1994; INNGJERDINGEN *et al.,* 2007, 2008). Desta forma demonstrando que em alguns casos, pequenas alterações na estrutura, no massa molecular ou na conformação do polissacarídeo pode ocasionar atividades biológicas distintas.

Outros polímeros provenientes de plantas, também apresentam efeito na produção, *in vitro*, de NO em macrófagos, como no caso do polissacarídeo neutro (Man:Glc:Gal - 100:206:5) obtido dos frutos de *Dendrobium officinale*, que aumentou de forma dose-dependente, a quantidade de NO produzidos por macrófagos RAW 264.7. Na concentração mais alta (1 mg/mL) a sua atividade ficou em torno 102,3% (MENG *et al.,* 2013).

A fração ricas em Glc, porém ausente de AG-II como a fração rica em Xyl e positiva pra AG-II de folhas de *Artemisia tripartita*, ambas concentração de 800 µg/mL, apresentaram potente estimulação da produção de NO em macrófagos J774.A1. Essa indução foi 16 vezes maior da apresentada pelo controle, macrófagos cultivados na ausência das frações polissacarídicas e, entretanto, atingiu cerca de 50% da produção induzida por LPS (50 ng/mL) (XIE *et al.,* 2008).

6.3.1.4 Efeito da fração W-1 sobre a capacidade de retenção de lisossomos por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

O ensaio do vermelho neutro é amplamente utilizado para a análise de viabilidade e citotoxicidade, *in vitro*, de cultura de células de mamíferos, bem como para a análise de ecotoxicidade em cultura de células de peixe. Tem como princípio a análise da absorção, por difusão passiva, e ligação eletrostática hidrofóbica do corante vital vermelho neutro a grupamentos aniônicos e/ou fosfato presentes na matriz lisossomal de células viáveis após incubação com agentes tóxicos (DAILIANIS *et al*., 2003; SVENDSEN *et al.,* 2004; REPETTO; PESO; ZURITA, 2008).

Para cultura de macrófagos, o ensaio de retenção de lisossomos, pode ser utilizado como um dos indicativos da atividade fagocítica. Este método analisa a taxa de fagocitose, através da análise do conteúdo das vesículas do compartimento endocítico, a qual o corante ficou retido. E a indução da taxa de retenção, por um determinado agente, está relacionada, diretamente, com a atividade imunoestimulante (CHATURVEDI *et al.*, 1979; CHATURVEDI; GULATI; MATHUR, 1982; STOIKA *et al.*, 2002 LENZI, 2011).

Como pode ser observado na FIGURA 40, nenhuma das concentrações utilizadas da fração W-1 de *A. esculentus* aumentou, de forma estatisticamente significativa, a captação e a retenção do corante vermelho neutro, quando comparado com o grupo controle.

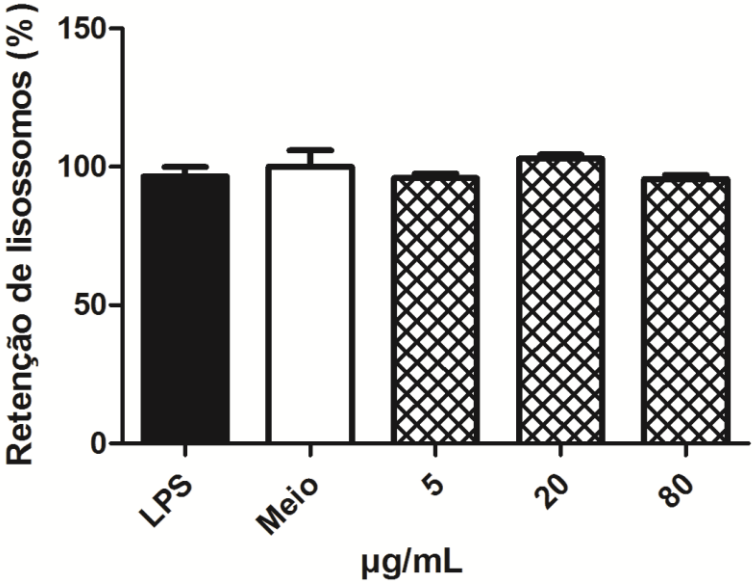



**FIGURA 40** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24 H DE TRATAMENTO SOBRE A CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE LISOSSOMOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS
FONTE: O autor
NOTA: Meio foi MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados durante 24 h, em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37 ºC, na ausência e presença de diferentes concentrações da fração W-1. A capacidade de retenção de lisossomos foi avaliada segundo o método descrito por Pipe, Coles e Farley (1995), através do teste com o vermelho neutro.
**LPS** - 50 ng/mL**; Meio** - Controle negativo composto somente pelo meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino; Soluções da fração **W-1**, nas concentrações de 5, 20, 80 µg/mL.

Cheng e colaboradores (2008) isolaram polissacarídeos, através da extração aquosa de raízes de *Glycyrrhiza uralensis*. Este polissacarídeo neutro, rico em Gal, Glc e Ara, aumentou a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Todas as concentrações testadas, 10, 100, 200, 400 µg/mL, apresentaram efeito estatisticamente significativo, e a atividade foi dose-dependente, em tratamento de 4 h. Guan *et al*. (2011) demonstraram que polissacarídeos provenientes de extrações aquosas de raízes de *Actinidia kolomikta*, nas concentrações de 2,5 e 10 µg/mL, também apresentaram efeito dose-dependente na atividade fagocítica de macrófagos da linhagem RAW 264.7, em tratamento de 24 h, porém não mencionaram a composição química deste polímero.

Complexos polissacarídeo-proteína (Rib, Rha, Ara, Xyl, Man, Glc e Gal - 4,85:1,06:14,55:1:28,36:70,89:8,58) obtidos dos frutos de *Dimocarpus longan*, nas concentrações de 50 a 200 µg/mL em camundongos *Kunming* (*Specific pathogen-free Kunming mice*) também apresentaram efeito dose-dependente na atividade

fagocítica de macrófagos da linhagem, RAW 264.7, em tratamento de 24 h (YI *et al.,* 2011).

Na literatura existem estudos semelhantes avaliando a fagocitose de macrófagos expostos a tratamentos de apenas 1h de duração com diferentes moléculas teste (CHATURVEDI; GULATI; MATHUR, 1982). Para uma melhor validação da capacidade de retenção dos lisossomos, pela fração W-1, é necessário a realização do mesmo experimento utilizando tempos de tratamentos inferiores a 24 h para confirmar se a fração W-1 atua sobre a retenção dos lisossomos.

6.3.1.5 Efeito da fração W-1 sobre a produção de citocinas em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

As citocinas são glicoproteínas produzidas, predominantemente, pelos leucócitos. Estas moléculas regulam a imunidade inata e adquirida, a inflamação e a hematopoiese. Sua secreção, geralmente, é breve e autorregulada (KHAN, 2008).

A fração W-1, obtida dos frutos de *A. esculentus*, foi analisada, através de kits ELISA, quanto a sua capacidade de estimular a produção e liberação de citocinas. As FIGURAS 41 a 44 demonstram a produção das citocinas IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-10, por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss, após tratamento de 24 h, com concentrações de 5, 20 e 80 µg/mL.

A FIGURA 41 demonstra, que na ausência de qualquer estímulo (meio), os macrófagos peritoneais produziram, em média, 33 $pg.mL^{-1}/1 \times 10^{6}$ células da interleucina 1β (IL-1β). Quanto estimuladas, com LPS (50 ng/mL), os macrófagos aumentaram a produção e liberação em cerca de 1000% desta citocina. As concentrações da fração W-1 testadas, 5, 20 e 80 µg/mL, proporcionaram a inibição da liberação desta interleucina, pois a taxa de produção foi inferior à produzida pelas células cultivadas somente em meio MEM. A concentração de 80 µg/mL, foi a amostra que apresentou, maiores quantidades de IL-1β, porém foi de somente 24% em relação ao controle negativo.

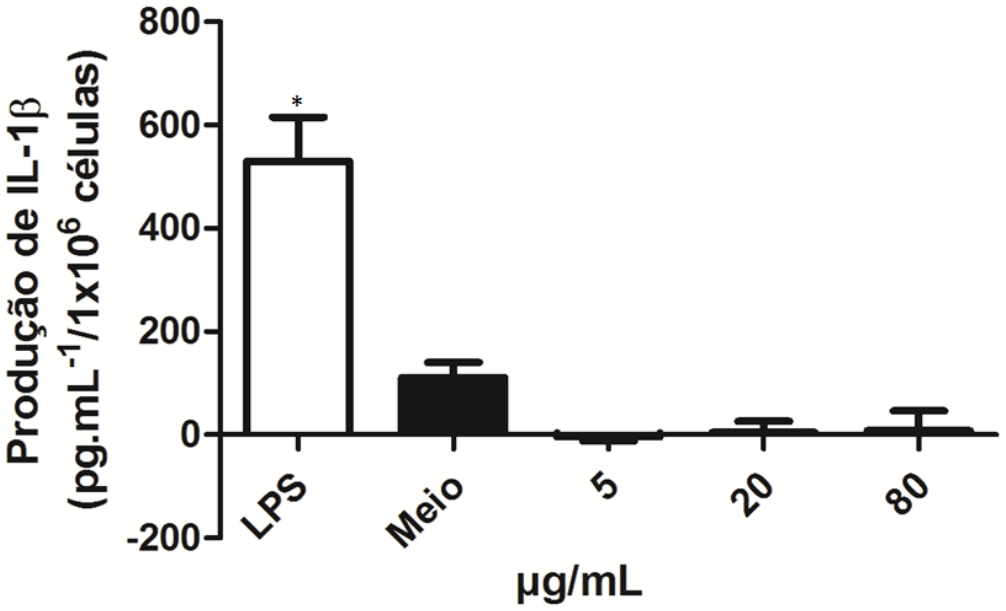



**FIGURA 41** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24 H DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1β POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS
FONTE: O autor
NOTA: Meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados, em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37 ºC, na ausência e presença de diferentes concentrações da fração W-1. O sobrenadante foi coletado, e a produção da IL-1β, foi analisada, através de kit ELISA específicos para IL-1β.
**LPS** - 50 ng/mL**; Meio** - Controle negativo composto somente pelo meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino; Soluções da fração **W-1**, nas concentrações de 5, 20, 80 µg/mL; **(*)** - Diferença significativa em relação ao controle negativo segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação ao fator de necrose tumoral α (TFN- α), os macrófagos presentes no grupo controle negativo, produziram em torno de 16 $pg.mL^{-1}/1 \times 10^6$ células. Quando estimulados, com LPS (50 ng/mL), essa concentração aumentou, cerca de 8 vezes (855%). As diferentes concentrações da fração W-1, induziram a produção e liberação desta citocina, como pode ser observado na FIGURA 42. As concentrações testadas, 5, 20 e 80 µg/mL, apresentaram uma produção de 227, 404 e 333%, respectivamente, em relação ao grupo incubado somente com meio.

Macrófagos ativados, apresentam a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enzima que proporciona a geração de grandes quantidades de NO, para a defesa do hospedeiro contra vírus e bactérias. Estímulos causados pela citocina IFN-γ juntamente com moléculas, como o LPS, geram a superexpressão de iNOS. Estudos demonstram, que o TNF-α, uma das citocinas reguladoras da atividade antimicrobiana dos macrófagos, pode agir de forma sinérgica com IFN- γ, na indução

da produção de NO• via receptor CD40 presentes em macrófagos (LIN *et al*., 1994; RIMBACH *et al*., 2000; PORTILLO *et al*., 2012).

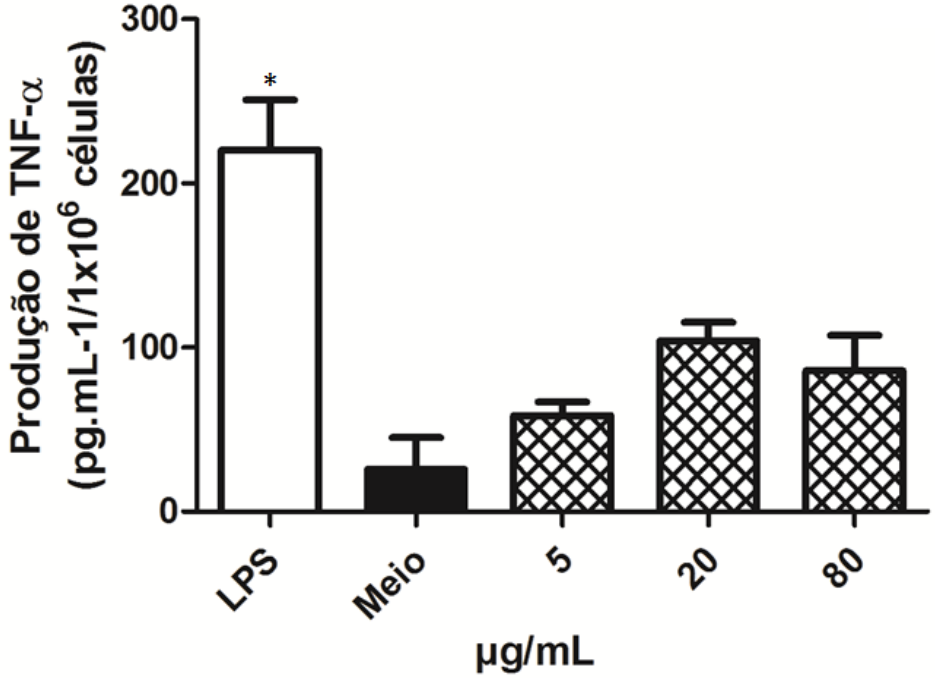



**FIGURA 42** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24 H DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF-α POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS
FONTE: O autor
NOTA: Meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados, em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37 ºC, na ausência e presença de diferentes concentrações da fração W-1. O sobrenadante foi coletado, e a produção da TNF-α, foi analisada, através de kit ELISA específico para TNF-α.
**LPS** - 50 ng/mL**; Meio** - Controle negativo composto somente pelo meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino; Soluções da fração **W-1**, nas concentrações de 5, 20, 80 µg/mL; **(*)** - Diferença significativa em relação ao controle negativo segundo o teste de Tukey (p≤0,05).

A interleucina 6 (IL-6), foi a citocina encontrada em maior concentração no sobrenadante dos macrófagos cultivados durante 24 h. No grupo controle, a concentração desta molécula ficou em torno de 54456 $pg.mL^{-1}$/ 1 x $10^6$ células. Quando estimulados, com LPS (50 ng/mL), os macrófagos aumentaram, de forma significativa, a produção desta interleucina em torno de 2,6 vezes (267%). A fração W-1, não causou grandes alterações na taxa de produção desta interleucina, em relação ao grupo controle negativo, sendo a produção obtida nas concentrações de 5, 20 e 80 µg/mL de 92,3%, 130,5% e 114,3%, respectivamente, em relação ao grupo controle negativo, como demonstrado na FIGURA 43.

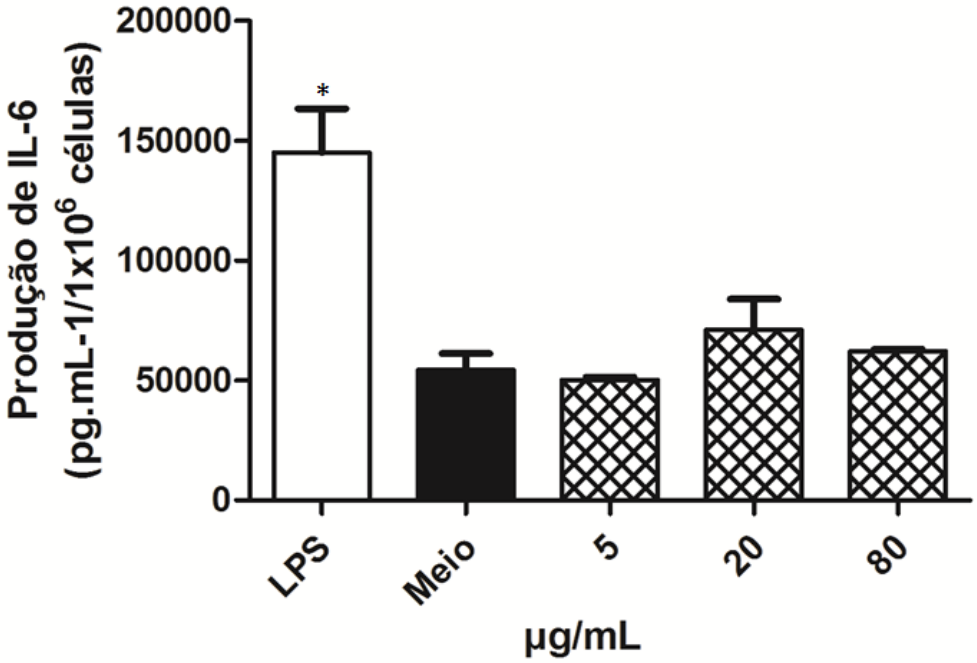



**FIGURA 43** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24 H DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS
FONTE: O autor
NOTA: Meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados, em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37 ºC, na ausência e presença de diferentes concentrações da fração W-1. O sobrenadante foi coletado, e a produção da IL-6, foi analisada, através de kit ELISA específico para a IL-6.
**LPS** - 50 ng/mL**; Meio** - Controle negativo composto somente pelo meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino; Soluções da fração **W-1**, nas concentrações de 5, 20, 80 µg/mL; **(*)** - Diferença significativa em relação ao controle negativo segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A fração W-1 não causou efeito sobre a produção da interleucina anti-inflamatória, IL-10. A produção desta citocina pelos macrófagos peritoneais, em diferentes concentrações da fração, ficou em torno de 91%, daquela apresentada pelas células que cultivadas somente no meio de cultura, enquanto, as estimuladas, pelo LPS (50 ng/mL), a produção da IL-10, sofreu aumento de 140% (FIGURA 44).

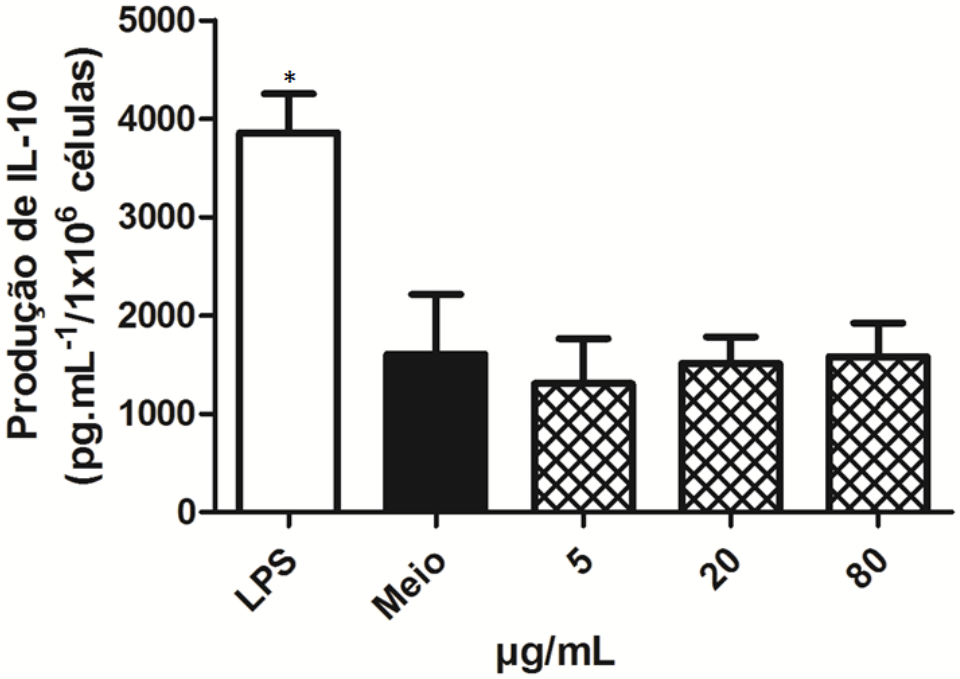



**FIGURA 44** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 DE *A. esculentus* APÓS 24 H DE TRATAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-10 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS
FONTE: O autor
NOTA: Meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados, em atmosfera de 5% de $CO_2$ a 37 ºC, na ausência e presença de diferentes concentrações da fração W-1. O sobrenadante foi coletado, e a produção da IL-10, foi analisada, através de kit ELISA específico para a IL-10.
**LPS** - 50 ng/mL**; Meio** - Controle negativo composto somente pelo meio MEM suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino; Soluções da fração **W-1**, nas concentrações de 5, 20, 80 µg/mL; **(*)** - Diferença significativa em relação ao controle negativo segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os polissacarídeos vegetais exibem efeitos biológicos benéficos através da sua capacidade de modular componentes do sistema imunológico, como os macrófagos. Estas células desempenham importantes papéis na defesa inicial do hospedeiro através da fagocitose de agentes patogênicos e células apoteóticas. Após, os macrófagos processam e apresentam os antígenos capturados, com consequente liberação de mediadores imunes, como as citocinas (HUME, 2006). Agentes que ativem estas células e/ou modulem as ações desenvolvidas, tornando um grande alvo de pesquisas científicas (PAULSEN, 2001; PAULSEN; BARSET, 2005; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

A ativação dos macrófagos é mediada através de receptores específicos que se associam a moléculas exógenos durante as fases iniciais da resposta imune. Receptores como *Toll-like* 4 (TLR4), CD14, receptor de complemento 3 (CR3 - *complement receptor* 3), Mac-1, receptor *scavanger*, e receptores de manose e dectina-1, podem estar envolvidos na ligação dos polissacarídeos e glicoproteínas

vegetais pelos macrófagos. Este reconhecimento específico, podem conduzir a cascatas de sinalização intracelular, resultando na ativação da transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias (GORDON, 2002; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

A IL-1, IL-6 e o TNF-α são exemplos típicos de citocinas pró-inflamatórias. Estas moléculas multifuncionais estão envolvidas na regulação da resposta imune, na hematopoiese e na inflamação. Suas funções, geralmente, estão sobrepostas, porém cada uma apresenta suas propriedades características, como demonstradas na TABELA 14.

**TABELA 14** - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DESENVOLVIDAS PELAS CITOCINAS IL-1, IL-6 E TNF-α

| | **Produtores** | **Atividade biológica** |
|---|---|---|
| **IL-1** | Macrófagos, queratinócitos, células endoteliais, Linfócitos T e B, astrócitos, micróglia e fibroblastos | Indução:<br>da síntese de PGE2;<br>do crescimento de fibroblastos;<br>da reabsorção óssea;<br>da expressão de ICAM-1;<br>da febre e sono;<br>da síntese de colágeno;<br>e do crescimento e diferenciação de linfócitos T e B |
| **IL-6** | Macrófagos, linfócitos T e B, queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos, astrócitos, células mesangiais e do estroma da medusa óssea | Indução:<br>da diferenciação de linfócitos B;<br>do crescimento de plasmacitoma;<br>da síntese de proteínas da fase aguda;<br>da ativação e diferenciação de linfócitos T,<br>da diferenciação de macrófagos;<br>do crescimento de células-tronco hematopoiética;<br>da maturação de magacariócitos;<br>da diferenciação de células neurais;<br>e do crescimento de células mesangiais |
| **TNF-α** | Macrófagos, linfócitos T e células NK. | Atividade tumoricida;<br>Inibição da lipoproteína lipase;<br>Indução:<br>da reabsorção óssea;<br>da atividade pró coagulante;<br>do crescimento e diferenciação de linfócitos B;<br>E da expressão de ICAM-1 |

FONTE: Adaptado de AKIRA *et al.* (1990).
NOTA: **PGE2** - Mediador lipídico prostaglandina-E2; **ICAM-1** - molécula de adesão.

Sabe-se que durante a fase aguda do processo inflamatório, as citocinas IL-1β e TNF-α são inicialmente liberadas por macrófagos ativados, e estas, induzem a

secreção de IL-6 por uma variedade de tipos celulares (KÜNDIG *et al.*, 1993). Os dados obtidos demonstram que a fração W-1 induziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-6, entretanto, inibiu a produção de IL-1β. Sugere-se, que essa inibição não tenha ocorrido através de citocinas anti-inflamatórios, pois a fração W-1 não alterou a produção da citocina de IL-10, como demonstrado na TABELA 15.

**TABELA 15** - EFEITO DA FRAÇÃO W-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS

| | **IL-1β** | **TNF-α** | **IL-6** | **IL-10** |
|---|---|---|---|---|
| | | **%** | | |
| **LPS (C+)** | 1599* | 855* | 267* | 240* |
| **5 µg/mL** | - | 227 | 92 | 81 |
| **20 µg/mL** | 13 | 404 | 130 | 94 |
| **80 µg/mL** | 24 | 333 | 114 | 98 |

FONTE: O autor
NOTA: Dados relativos ao controle negativo – 100%; **(*)** - Diferença significativa em relação ao teste de Tukey (p≤0,05).

Não existem dados na literatura elucidando a inibição da produção de IL-1β. Entretanto sabe-se, que há dois receptores para IL-1. O tipo I (IL-1RI), é um receptor de transdução de sinal, ao passo que o tipo II (IL-1RII), também chamado de receptor *decoy*, atua como dissipador, diminuindo a resposta de IL-1. Uma porção de IL-1RII, é encontrada em fluidos corporais, e acredita-se que isto ocorra através da clivagem do domínio extracelular deste receptor. Existe uma regulação entre esses dois receptores, causados por fatores externos. Como por exemplo, em neutrófilos, a expressão de IL-1RII, pode ser *upregulated* na presença de IL-4. Também existe a possibilidade de regular IL-1, através do seu receptor de transdução de sinal (IL-1RI). Isso ocorre devido a existências de três moléculas pertencentes a família IL-1: IL-1α, IL-1β e um antagonista de receptor de IL-1, chamado de IL-1Ra. A IL-1α, exerce uma função mais local, devido a carência de sítios de clivagem, desta forma, grande parte desta interleucina fica associada a célula, tanto intracelularmente, atuando como fatores nucleares, quanto na membrana celular, colaborando com a apresentação de antígeno. A forma IL-1β, é a secretada pelas células estimuladas e a IL-1Ra, apresenta a capacidade de competir

com a IL-1 no receptor de transdução de sinal (IL-1RI), porém, o antagonista apresenta maior afinidade, desta forma diminuindo a resposta das IL-1, sem ativar a célula (DINARELLO, 1988, 1996, 2006; HURME; SANTTILA, 1998).

Estes fatos, em relação aos dados obtidos são meramente hipóteses, pois não existe dados na literatura relacionando estas circunstâncias. Porém, quanto ao comportamento pró-inflamatório como um todo, existem trabalhos com polissacarídeos derivados de plantas, que demonstram que estes induzem a produção desta citocinas em macrófagos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007; XIE *et al.,* 2008).

Polissacarídeos ácidos, obtidos de extração aquosa das flores de *Tanacetum vulgare*, mostram efeitos sobre a produção de citocinas sobre macrófagos. Após purificação, as frações obtidas apresentaram composição monossacarídica semelhante a apresentada pelo dados de GC-MS das frações obtidas de *A. esculentus*. Os componentes majoritários, obtidos destas flores, se dá por Gal e GalA e, em menor proporção, por Ara e Rha. Das quatro frações obtidas, somente a primeira, não demonstrou a presença de AG-II (pelo teste com Yariv β-Glucosil). As duas frações de maior massa molecular, em concentrações acima de 400 µg/mL, induziram de forma semelhante ao trabalho, a produção de TNF-α sobre macrófagos J774.A1. Por outro lado, as duas frações de menor massa, não conseguiram estimular a produção de TNF- α, em nenhuma das concentrações testadas (100 a 800 µg/mL), em tratamento de 24 h. Entretanto, as amostras utilizadas pelos autores apresentavam, em média, 1,75 ng/mL de LPS, a qual pode ter influenciado, em parte, os resultados obtidos (XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007). Diferente deste trabalho citado, no presente estudo as células foram cultivadas na presença das amostras juntamente com polimixina B (20 µg/mL), um potente antibiótico lipopeptídico, que interagem com o LPS de parede celular bacteriana, promovendo alterações e as inativando (ZAVASCKI *et al.*, 2007).

O mesmo grupo de pesquisa, realizou estudos semelhantes ao do presente trabalho, porém utilizando polissacarídeos obtidos de extrações aquosas das folhas de *Artemisia tripartita.* A composição monossacarídica obtida foi em maior proporção de Xyl, Glc, Ara, Gal e GalN e em menor relação os urônicos (GalA e GlcA). Todas a amostras obtidas foram testadas em tratamentos de 24 h, sobre a produção de citocinas em macrófagos J774.A1. Os autores demonstrara que estas frações, na concentração de 800 µg/mL, estimularam os macrófagos a produzirem tanto

citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, TNF-α e MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1), quanto anti-inflamatórias, a IL-10 (XIE *et al*., 2008).

Meng *et al.* (2013) relataram que polissacarídeos obtidos de espécies do gênero *Dendrobium sp*. (*D. officinale*, *D. fimbriatum*, *D. nobile*, *D. chrysotoxum; D. huoshanense*), apresentaram efeitos sobre macrófagos RAW 264.7. Soluções de diferentes concentrações (100, 300 e 1000 µg/mL) dos polissacarídeos obtidos de extrações aquosas das plantas mencionadas anteriormente, compostos principalmente de Man, Glc e Gal, apresentaram efeitos dose-dependente sobre a produção de citocinas. Semelhante ao trabalho, o nível produzido da IL-1, foi o menor de todas as citocinas, porém no caso do *Dendrobium sp*, estes polímeros aumentaram a produção desta citocina de forma dose-dependente. Todos os polissacarídeos obtidos por estes autores apresentaram grande efeito (cerca de 300 vezes em relação ao grupo controle) sobre a produção de TNF-α e IL-6, entretanto, neste último, as frações obtidas de *D. chrysotoxum, D. fimbriatum*, *D. huoshanense*, só apresentaram efeito em concentrações altas, como de 300 e 1000 µg/mL (MENG *et al*., 2013).

Os polissacarídeos provenientes das hastes de *Opuntia polyacantha*, também apresentaram efeitos sobre a produção de citocinas em macrófagos J774.A1. Neste estudo, os componentes obtidos da extração aquosa, foram fracionados por cromatografia de exclusão com Sepharose 6B. As quatro frações obtidas com massas moleculares distintas, apresentaram composição monossacarídica semelhante (Gal, GalA, Xyl, Ara com proporções variando de 34-48:15-19:17-29:10-15:6-12), sendo as duas últimas positivas para AG-II (teste com o Yariv β-Glc). Todas as frações obtidas pelos autores aumentaram a produção de IL-6 e TNF-α em macrófagos J774.A1. A produção de TNF-α gerada pela fração de maior massa molecular foi a que apresentou maior resultado, de forma que nas concentrações mais baixas (20 e 40 µg/mL), o efeito obtido por esta fração polissacarídica foi proporcional ao apresentado pela estimulação com LPS (50 ng/mL). Os autores sugerem que o efeito imunomodulador obtido por esta fração, provavelmente, não está relacionado pela presença de AG-II, mas sim devido à alta massa molecular. Esta característica, juntamente com a sua estrutura altamente repetitiva, seriam os responsável pelas propriedades de ativação dos macrófagos por este polissacarídeo, através de ligações cruzadas em receptores e a outros componentes da membrana plasmática (SCHEPETKIN *et al.,* 2008).

Kouakou *et al*. (2013) relataram que a fração ácida e de alta massa molecular (38,5 kDa) e composta, majoritariamente, por GalA, Ara, Gal, Rha, Glc, GlcA, Man, (11:17,1:27:11,1:11,1:3,8:5,6), obtidas da folhas de *Clerodendrum splendens*, apresentaram grande efeito sobre a produção de IL-10, IL-6, TNF, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1* ou proteína quimioatraente de monócitos) e as quimiocinas polimerizantes de proteínas inflamatória 1α derivada de macrófagos (MIP-1α/CCL3) e 1β (MIP-1β/CCL4) por células mononucleares do sangue periférico e monócitos/macrófagos humanos. Os autores sugerem que a produção de citocinas produzidas por este polímero foi via TLR4, pois, quando testada com antagonista do receptor TLR4, a produção das citocinas foi interrompida.

Outra característica que pode estar relacionada à produção de citocinas, é o tempo de tratamento. Cheng e colaboradores (2008), relatam que os polissacarídeos neutros, compostos principalmente por Gal, Ara, Glc, obtido das raízes de *Glycyrrhiza uralensis*, apresentaram efeito dose-dependente (10 a 400 µg/mL), sobre a produção de IL-1, IL-6 e IL-12 em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, sendo o tratamento de 72 h, o que apresentou efeito comparável e/ou superior ao encontrado pelo LPS (2 µg/mL).

### 6.3.2 Avaliação da atividade antioxidante de todas as frações obtidos dos frutos de *A. esculentus*

Existem diversos métodos *in vitro* para avaliar se uma molécula bioativa apresenta ou não a atividade antioxidante. Estes testes, englobam desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando diversas técnicas instrumentais e, tornaram-se metodologias corriqueiras e eficientes para as análises de substâncias com potenciais antioxidantes. Contudo, os resultados obtidos de um único experimento *in vitro* não são de caráter conclusivo, e a divergência envolvida gera grande dificuldade em relacionar um experimento com outro. Porém, estes testes auxiliam na escolha inicial da espécie vegetal, através da comprovação da presença de compostos bioativos, encorajando futuros estudos químicos e farmacológicos mais complexos (ALVES *et al.,* 2010; ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

No presente trabalho, utilizou-se três métodos para avaliar a atividade antioxidante: a formação do complexo fosfomolibdênio, a que utiliza as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o que envolve a capacidade quelante de íons ferroso.

Os resultados obtidos pelo ensaio de formação do complexo fosfomolibdênio demonstram que a atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico (200 µg/mL - AAR%) apresentada por todas as frações obtidas (1 mg/ml), foi em média de 3,75%. A fração 0.1Ca (ácido cítrico 0,1%, m/v, 60 ºC) e a fração W-1 (aquosa, temperatura ambiente) foram as que apresentaram maiores atividades, sendo de 7,37% e 6,11% respectivamente. Os resultados estão apresentados na TABELA 16.

**TABELA 16** - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE TODAS AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DOS FRUTOS DE *A. esculentus*

| | **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE** | | |
|---|---|---|---|
| | **Fosfomolibdênio (AAR%)** | **TBARS (IA%)** | **Quelação de Ferro (Q%)** |
| | Ác. ascórbico [1] | BHT [2] | EDTA [3] |
| | 100 | 49,9±1,09 | 100 |
| **W-1** | 6,11±0,49 | 13,12±1,09 | 9,84±0,27 |
| **W-2** | 1,15±0,87 | 7,74±0,54 | 10,20±0,47 |
| **W-3** | 4,61±0,91 | 9,79±1,09 | 9,63±0,53 |
| **W-4** | 3,80±0,20 | 6,72±0,81 | 8,63±0,72 |
| **HW** | 4,72±0,24 | 11,07±2,44 | 12,42±1,59 |
| **0.1Ca** | 7,37±0,91 | 0,58±0,54 | 7,64±0,78 |
| **0.1Ca(2)** | 1,38±0,24 | 0,19±1,09 | 9,76±0,34 |
| **1Ca** | 1,38±0,24 | 0* | 10,20±0,19 |
| **1Ca(2)** | 3,23±0,53 | 0* | 8,65±0,63 |

FONTE: O autor
NOTA: Dados apresentados em percentagem (%±DV). Amostras testadas na concentração de 1 mg/mL.
[1] - Padrão: Ácido ascórbico na concentração de 200µg/mL; [2] - Padrão: Butil-hidroxitolueno (BHT) na concentração de 1 mg/mL; [3] - Padrão : Ácido etienodiamino tetracético (EDTA) na concentração de 100 µg/mL. * - ≤ 0.

O ensaio utilizando a formação do complexo fosfomolibdênio foi utilizado para averiguar se as todas as frações polissacarídicas obtidas apresentam a capacidade de reduzir o molibdênio IV (Mo IV) a molibdênio V (Mo V). Neste ensaio, atividade

antioxidante obtida pelas amostras, é relativa à atividade apresentada pelo ácido ascórbico (AAR%), um antioxidante de origem natural que proporciona proteção contra a oxidação descontrolada no meio aquoso celular, porém não é capaz de agir em compartimentos lipofílicos, desta forma, sendo incapaz de inibir a peroxidação dos lipídeos (ODIN, 1997).

Em relação ao índice antioxidante (IA%), obtido através do teste das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), as frações demonstraram, em média, um índice oxidante (IA%) de 6,89%, indicando, que estas amostras não apresentam grande capacidade em inibir a peroxidação lipídica, quando comparado com o padrão. O BHT, padrão utilizado, apresentou IA% de 49,9%, como demonstrado na TABELA 16. As frações, W-1 e W-3, obtidas da 1ª e 3ª extração aquosa à temperatura ambiente, foram as que apresentaram os melhores resultados, 9,40% e 6,91% respectivamente. Os resultados negativos gerados pelas frações 1Ca e 1Ca(2), obtidas das extrações a 60 ºC e banho-fervente, ambas em ácido cítrico 1%, indicam, que as frações podem apresentam atividade pró-oxidante, entretanto, experimentos adicionais precisam ser feitos para realmente verificar essa possibilidade,

Todos os componentes celulares estão suscetíveis à ação das espécies reativas (ER), porém, a membrana celular é um dos componentes mais atingidos. A peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presente na membrana, gera alterações estruturais e também sobre a permeabilidade. Este fato acarreta a perda seletiva na troca iônica e da liberação do conteúdo de organelas, como nas enzimas hidrolíticas dos lisossomos, além de gerar a formação de produtos secundários citotóxicos, como o malonaldeído (MDA) (MELLO-FILHO; HOFFMANN; MENEGHINI, 1984; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O ensaio, *in vitro*, das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), é um modelo experimental, que tem como princípio a quantificação dos produtos secundários formados pela peroxidação, induzida pelo 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) (ABAP), dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na gema do ovo. O MDA gerado, por sua vez, reage, via catálise ácida, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando complexo colorimétrico, o qual pode ser quantificado em leitura em comprimento de onda de 532 nm (HODGES *et al.,* 1999).

O ensaio de quelação de ferro, *in vitro*, utiliza o sol dissódico de ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil1,2,4- triazina4',4''-dissulfónico, comercialmente chamado

FerroZine®. Esta molécula quelante forma complexos colorimétrico com os íons e a atividade quelante é demonstrada pela habilidade das amostras em competir com o FerroZine® na quelação dos $Fe^{2+}$. Dentre os ensaios antioxidantes, este foi o que as frações obtidas apresentaram melhores resultados, porém, da mesma forma que os anteriores, a Q%, foi relativamente baixa. As amostras apresentaram, em média, 9,66% e a capacidade quelante de todas as amostras, foram relativamente semelhantes, como pode ser observado na TABELA 16.

No presente trabalho as frações polissacarídicas provenientes dos frutos de *A. esculentus* não apresentaram atividades antioxidantes significativas nos testes utilizados. Devido à escassez de dados na literatura, em relação aos modelos experimentais antioxidante utilizados, para comparação de resultados, sugere-se que os resultados obtidos ocorreram devido as características químicas das frações polissacarídicas obtidas e ao baixo de teor de compostos fenólicos.

Sabitha *et al*. (2012) demonstrou que outras estruturas de *A. esculentus* podem apresentar atividade antioxidante. O pó bruto das sementes e cascas, diminuíram os níveis de TBARS, *in vivo*, utilizando como modelo experimental ratos diabéticos induzidos por *streptozotocina* (STZ). Khomsug e colaboradores (2010) também utilizaram extratos brutos obtidos dos frutos e sementes de *A. esculentus*, entretanto, extraídos com solvente orgânico metanol. As frações obtidas, foram ricas em composto fenólicos, onde, o elemento majoritário da semente foi a procianidina B2 e nos frutos foram as epicatequinas, caquetinas e procianidina B2. A atividade antioxidante de ambas as frações, diferentemente dos observados no presente trabalho, foram relativamente altas. Os ensaios de *scavenging* do radical DPPH e 2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), demonstraram que a fração obtida da semente, rica em procianidina B2, apresentou maior atividade que o fruto (KHOMSUG *et al*., 2010). Estes dados corroboram com os obtidos por Liao, Dong, Shi e Yuan (2012a) utilizando extratos metanólicos dos frutos, folhas, sementes e flores de *A. esculentus*, sendo a última, fração com maior conteúdo fenólico e de flavonoides, a que apresentou a maior atividade de *scavenging de* DPPH e de redução do ferro (FRAP - *Ferric reducing antioxidant power*). O mesmo grupo de pesquisa (LIAO *et al*., 2012b) extraíram dos frutos, dois glicosídeos flavonoides que, também, apresentaram forte habilidade *scavenging* de DPPH e FRAP. Oliveira e colaboradores (2012), realizaram ensaios com outras espécies da família Malvaceae, a qual o *A. esculentus* é pertencente, e também concluíram que

a atividade antioxidante, está estritamente relacionada com o conteúdo de compostos fenólicos. Desta forma, sugere-se que a atividade biológica apresentada por *A. esculentus*, está mais relacionada com os seus componentes do metabólito secundário, como os compostos fenólicos.

Novos estudos utilizando concentrações diferentes devem ser realizados, pois testes para atividade antioxidante, realizados no mesmo grupo pesquisa (NUPPLAMED), demonstraram que a fração W-1 proveniente dos frutos de *A. esculentus*, em concentrações variando de 50 a 800 μg/mL, apresentaram atividade dose-dependentes frente aos ensaios do sequestro (*scavenging)* do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), do poder redutor e da capacidade de poder redutor (OLIVEIRA, 2011). Kong *et al*. (2010) demonstram que as frações polissacarídicas compostas por Ara, Rha, Rib, Gal e Glc, com proporções variando de 1,95-1,30:2-1,9:1-1,5:2-2,1:1-1,57, obtidas através de extrações aquosas da polpa da lichia (*Litchi chinensis*), apresentaram atividades antioxidativas frente aos ensaios de *scavenging* do radical DPPH, do ânion superóxido e do radical hidroxila, além da habilidade de quelar íons ferroso e poder redutor de forma dose-dependente (KONG *et al*., 2010), da mesma forma relatada pelos polissacarídeos obtidos de extrações aquosas a quente (80 ºC, sem caracterização química) das hastes da orquídea Dendrobium (*Dendrobium chrysotoxu*) (ZHAO *et al*., 2007) e dos polissacarídeos ácidos, compostos em maior proporção por GalA, Gal, Ara e Rha ( 69:10:6,9:6,1), obtidos de extrações ácidas (HCl 0,05 N, 1:6, v/v, 80 ºC, 1 h) do grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (URIAS-ORONA *et al.,* 2010). Em ambos os trabalhos, a efeito foi dose-dependente para a atividade *scavenging* de DPPH e ânion superóxido.

# 7 CONCLUSÕES

## 7.1 Análises em relação as frações obtidas dos frutos de *A. esculentus*

- Os frutos desta planta são uma rica fonte de polissacarídeos vegetais. Os diferentes tipos de extrações geraram um rendimento total das frações de 18% de material em relação a massa deslipidificada e seca;

- Conclui-se que através das extrações em diferentes condições, dos frutos deslipificados e secos, as amostras obtidas, estão relativamente purificadas, e apresentam moléculas de alta massa molecular, que compreende frações pécticas altamente acetiladas;

- Sugere-se, que as frações obtidas compreendem ramnogalacturonanas do tipo I contendo, em pouca proporção, grupamentos fenólicos e proteínas;

- Em especial, os dados apontam que a fração W-1 é uma ramnogalacturonana tipo I acetilada, apresentando como cadeia principal uma estrutura de -2)-α-Rha-(1→4)-α-GalA-(1→2)-α-Rha-(1→4)-α-GalA-(1-;

- As arabinogalactanas-proteínas encontradas, possivelmente foram extraídas juntamente com as frações pécticas.

## 7.2 Análise em relação à atividade imunomoduladora *in vitro* da fração de maior rendimento, W-1, obtida dos frutos de *A. esculentus*

- Através da análise morfológica, e corroboração dos resultados mencionados, pode-se concluir, que a fração W-1 é capaz de ativar os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss;

- Nenhuma das frações testadas demonstrou efeito citotóxicos frente a macrófagos peritoneais de camundongos Swiss;

- Em tratamento de 48 h, a indução da produção de óxido nítrico foi aumentada de forma estatisticamente significativa, mesmo sem apresentar efeito sobre a retenção do corante vital vermelho neutro nos lisossomos;

- A fração W-1 foi capaz de induzir a produção de citocinas, pelos macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. Entretanto, a resposta observado foi diferente da apresentada pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). As frações induziram a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF-α, porém inibiu a produção da IL- β e não alterou a da anti-inflamatória IL-10. Os resultados sugerem que essa fração induz os macrófagos peritoneais murinos a resposta uma pró-inflamatório.

7.3 Análises em relação a atividade antioxidante *in vitro* das frações obtidas dos frutos de *A. esculentus*

- As frações obtidas, apresentaram, em média 3,75% de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico, segundo o experimento de formação do complexo fosfomolibdênio;

- Resultados melhores foram obtidos com os ensaios de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da capacidade quelante de íons ferroso, 6,89% e 9,66%, respectivamente, entretanto os resultados também são relativamente baixos, demonstrando que nenhuma das frações obtidas, apresentaram atividade antioxidante frente aos ensaios utilizados.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª Edição. Brasil: Editora Elsevier, 2008.

ADELAKUM, O. E.; OYELADE, O. J.; ADE-OMOWAYE, B. I; VAN DE VENTER, M. Chemical composition and the antioxidative properties of Nigerian Okra Seed (*Abelmoschus esculentus* Moench) Flour. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 47, n. 6, p. 1123-1126, 2009.

AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using folin-ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, vol. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.

AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 e TNF). **Federation of American Societies for Experimental Biology**, vol. 1, n. 11, p. 2860-2867, 1990.

ALAM, M. M.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 21, p. 143-152, 2013.

ALONSO, J. **Tratados de fitofármacos y nutracéuticos**. 2ª Edição. Argentina: Corpus Editorial y Distribuidora, 2007.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, vol. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Review: Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous DNA adducts/oxygen radical). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, vol. 90, p. 7915-7922, 1993.

AMES, J. M.; MACLEOD, G. Volatile components of okra. **Phytochemistry**, vol. 29, p. 1201-1207, 1990.

AMIN, E. S. The Mucilages of *Hibiscus esculentus* (Okra or Bamia fellahi) and *Corchorus olitorius* (Mulukhia). **Journal of the American Chemical Society**, vol. 78, p. 828-832.

AMMAR, N. M.; SINGAB, A. N.; EL-AHMADY, S.; EL-ANSSARY, A.; HAGGAG, E. G.; SHABBAN, R. Phytochemical and biological studies of some polysaccharides isolated from *Aloe*, *Tamarindus*, *Opuntia* and *Citrus*. **Journal of the Arab Society for Medical Researches (JASMR)**, vol. 5, p. 141-152, 2010.

ARCHANA, G.; SABINA, K.; BABUSKIN, S.; RADHAKRISHNAN, K.; FAYIDH, A.; BABU, P. A. S.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, vol. 98 p. 89-94, 2013.

ATAWODI, S. E.; ATAWODI, J. C.; IDAKWO, G. A.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Polyphenol composition and antioxidant potential of *Hibiscus esculentus* L. fruit cultivated in Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, vol. 12, n. 6, p. 1316-1320, 2009.

ATMODJO, M. A.; HAO, Z.; MOHNEN, D. Evolving views of pectin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 64, p. 747-749, 2013.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 73, n. 3, p. 599-601, 1984.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTLE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plants chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. **Science**, vol. 228, n. 4707, p. 1157-1160, 1984.

BALDWIN, T. C.; MCCANN, M. C.; ROBERTS, K. A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. **Journal of Plant Physiology**, vol. 103, p. 115-123, 1993.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, vol. 78, p. 431-441, 2005.

BARRETO, B, B. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde - A visão dos profissionais envolvidos**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

BEMILLER, J. N. Polysaccharides: Occurrence, significance and properties In: FRASER-REID, B.; TATSUTA, K.; THIEM, J. (eds). **Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology**. Springer, 2008. p. 1413-1435.

BENCHASRI, S. Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) as a valuable vegetable of the world. **Ratarstvo Vegetable Crops Research,** vol. 42, p. 105-112, 2012 and I Povrtarstvo/Field.

BENCHASRI, S.; DERAMAER, N. Investigation of yield and yield components of 10 accessions of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) in phatthalung province**. In:** Regional IMT-GT UNINET Conference and Joint PSU-UNS Bioscience Conferences (7th and 3rd), 2010, Songkhla - Tailândia. ***Proceedings****…7th IMT-GT UNINET and the 3rd International PSU-UNS Conferences on Bioscience* 29, 2010, p. 29-34.

BENHURA, M. A.; CHUDEWE. Characterization of the polysaccharide material that is isolated from the fruit of *Cordia abyssinica***. African Journal of Biochemistry Research**, vol. 5, n. 3, p. 95-101, 2011.

BEUTLER, B. Innate immunity: An overview. **Molecular Immunology**, vol. 40, p. 845-859, 2004.

BHAT, R.; THARANATHAN, R. Fractionation of okra mucilage and structural investigation of an acidic polysaccharide**. Carbohydrate Research**, vol. 148, p. 143-147, 1986.

BODGAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, vol. 2, p. 907-916, 2001.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, vol. 28, p. 3-14, 1995.

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**, vol. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, M. G. L.*;* PAUSA-SOUZA, J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V.; SANTOS, A. C. P.; SALIMENHA, M. F.; MONTE-MOR, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. **In**: Seminário sobre a economia mineira, XIV., 2010, Minas Gerais. ***Anais...****XIV Seminário sobre a Economia Mineira [Proceedings of the 14th Seminar on the Economy of Minas Gerais*.

BRASIL. Federação da Agricultura do Estado do Paraná. **Comissões Técnicas da FAEP - Quiabo**, 2013.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines - Linking plant biochemistry and physiology to human health**. Plant Physiology**, vol. 124, p. 507-514, 2000.

BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regulatory situation of herbal medicines. **A worldwide review**, Geneva, 1998.

BYEON, S. E.; LEE, J.; KIM, J. H.; YANG, W. S.; KIM, S. Y.; CHOUNG, ./ S.; RHEE, M. H.; CHO, J. Y. Molecular mechanism of macrophage activation by red ginseng acid polysaccharide from Korean red ginseng. **Mediators of Inflammation**, vol. 2012, p. 1-7, 2012.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, vol. 344, p.1879-1900, 2009.

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

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

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, vol. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHARRIER, A. Genetic resources of the genus *Abelmoschus* Med. (Okra). **In:** International Board for Plant Genetic Resources IBPGR**,** Rome, 1984.

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

CHATURVEDI, U. C.; MATHUR, A.; TANDON, P.; NATU, S. M.; RAJ-VANSHI, S.; TANDON, H. 0. Variable effect on peripheral blood leucocytes during JE virus infection of man**. Clinical & Experimental Immunology,** v.38, p.492-498, 1979.

CHENG, A.; WAN, F.; WANG, J.; KIN, Z.; XU, X. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. **International Immunopharmacology**, vol. 8, n. 1, p. 43-50, 2008.

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

CHIVIAN, E.; BERNSTEIN, A. How our health depends on biodiversity. In: International Year of Biodiversity - United Nations. 2010, **Center for Health and the Global Environment** - Harvard Medical School.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. I.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora Unicamp, 2006.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RULEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The Journal of Immunology**, vol. 180, p. 5771-5777, 2008.

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

CUNHA, A. P. Aspectos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. In:_____. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**: Fundação Calouste Gulbenkian. 1. ed. Coimbra, 2003

DAILIANIS, S.; DOMOUHTSIDOU, G.P.; RAFTOPOULOU, E.; KALOYIANNI, M.; DIMITRIADIS, V.K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring**.** **Marine Environmental Research**, vol. 56, n. 4, p. 443-470, 2003.

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

DELGOBO, C. L.; GORIN, P.A.J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, vol. 47, n. 7, p. 1207-1214, 1998.

DETERS, A. M.; LENGSFELD, C.; HENSEL, A. Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 102, p. 391-399, 2005.

DINARELLO, C. A. Biology of interleukin 1. **Cytokine e Growth Factor Reviews**, vol. 8, n. 4, p. 253-65. 1996.

DINARELLO, C. A. Biology of interleukin 1. **The FASEB Journal**, vol. 2, p.108-115, 1988.

DINARELLO, C. A.Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process1–4. **The American Journal of clinical Nutrition**, vol. 83, p. 447S-455S.

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

EJECHI, O.; OJEATA, A.; OYELEKE, S. B. The effect of extracts of some Nigerian spices on biodeterioration of Okro (*Abelmoschus* (L) Moench) by fungi. **Journal of Phytopathology**, vol. 145, p. 469-472, 1997.

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

EL-MAHDY, A. R; EL-SEBAIY, L. A. Preliminary studies on the mucilages extracted from okra fruits, taro tubers, jew's mellow leaves and fenugreek Seeds. **Food Chemistry**, vol. 14, n. 4, p. 237-249, 1984.

FAN, H.; MAZZA, G.; LIAO, X. Purification, composition and antioxidant activity of polysaccharides from wolfberry, cherry, kiwi and cranberry fruits. **Croatian Journal of Food Science and Technology**, vol. 2, n.1, p. 9-17, 2010.

FAN, S.; GUO, L.; ZHANG, Y.; SUN, Q.; YANG, B.; HUANG, C. Okra polysaccharide improves metabolic disorders in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, vol. 57, n. 11, p. 2075-2078, 2013.

FEDERMAN, S. R.; MANSUR, H. S.; STANCIOLI, E. F. B.; VASCONCELOS, W. L. Avaliação da biocompatibilidade do compósito aço/filme bioativo SiO2-CaO para aplicação biomédica. **Cerâmica**, vol. 55, p. 257-262, 2009.

FERREIRA, A, L. Propriedades **Vibracionais de Polissacarídeos naturais**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 43, n. 1, p. 61-69, 1997.

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

FINA, D.; PALLONE, F. What Is the Role of Cytokines and Chemokines in IBD? **Inflammatory Bowel Diseases**, vol. 14, n. 2, p. 117-118, 2008.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; SANTOS-NETO, M.; OLEO, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisas (UFMA)**, vol. 18, n. especial, p. 90-95, 2011.

FISHMAN, M. L.; COOKE, P.; HOTCHKISS, A.; DAMERT, W. Progressive dissociation of pectin**.** **Carbohydrate Research**, vol. 248, p. 303-316, 1993.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, vol. 7, Outubro de 2006

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

FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, vol. 161, p. 642-675, 2004.

FURTADO, J. L.; OLIVEIRA, G. A.; PONTES, A. S.; SETÚBAL, S. S.; XAVIER, C.V.; LACOUTH-SILVA, F.; LIMA, B. F.; ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A2 isolated from *Bothrops atrox s*nake senom. **BioMed Research International**, vol. 2014, Article ID 683123, p. 1-13, 2014.

GILBERT, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. **Plant Physiology**, vol. 153, p. 444-455, 2010.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica *in vitro* de produtos naturais**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo, 2008.

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

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

GUAN, D.; ZHANG, Z.; YANG, Y.; XING, G.; LIU, J. Immunomodulatory Activity of Polysaccharide from the roots of *Actinidia kolomikta* on Macrophages. **International Journal of Biology**, vol. 3, n. 2, p. 3-10, 2011.

GÜRBÜZ, I.; ÜSTÜN, O.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; KUTSAL, O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 88, p. 93-97, 2003.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 27, p. 1-93, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, vol. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of pectin. **Plant Physiology**, vol. 153, p. 384-395, 2010.

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

HIRANO M, KIYOHARA H, MATSUMOTO T, YAMADA H. Structural studies of endopolygalacturonase-resistant fragments of an antiulcer pectin from the roots of *Bupleurum falcatum* L. **Carbohydrate Research**, vol. 251, p. 145-162, 1994.

HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, vol. 207, p. 604-611, 1999.

HORI, R.; SUGIYAMA, J. A combined FT-IR microscopy and principal component analysis on softwood cell walls. **Carbohydrate Polymers**, vol. 52, n. 4, p. 449–453, 2003.

HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology**, vol. 18, n. 1, p. 49-53, 2006.

HURME, M.; SANTTILA, S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 I genes. **European Journal of Immunology**, vol. 28, n. 9, p. 2598-2602, 1998.

HWANG, Y. C.; SHIN, K. S. Isolation and characterization of immuno-stimulating polysaccharide in Korean black raspberry wine. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, vol. 54, n. 4, p. 591-599, 2011.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 31, n. 1-3, p. 9-17, 2002.

IMMERZEEL, P. **Characterization of carrot arabinogalactan proteins**. 127 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Agrotecnologia e Ciências dos Alimentos, Wageningen University, Holanda, 2005.

INDIA. Ministry of Environment and Forests. Department of Biotechnology. Series of Crop Specific Biology Documents: **Biology of Okra**, 2009.

INNGJERDINGEN, K. T.; COULIBALY, A.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T.E.; PAULSEN, B. S. A Complement fixing polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch, a medicinal plant from Mali, West Africa. **Biomacromolecules**, vol. 7, n. 1, p. 48-53, 2006.

INNGJERDINGEN, K. T.; PATEL, T. R.; CHEN, X.; KENNE, L.; ALLEN, S.; MORRIS, G.; HARDING, S. E.; MATSUMOTO, T.; DIALLO, D.; TAMADA, H.; MICHAELSEN, T. E.; INGGJERDINGEN, M.; PAULSEN, B. S. Immunological and Structural Properties of a Pectic Polymer from *Glinus oppositifolius*. **Glycobiology**, vol. 17, n. 12, p.1299-1310, 2006.

INNGJERDINGEN, M.; INNGJERDINGEN,K.T.; PATEL, T. R.; ALLEN, ST.; CHEN, XI.; ROLSTAD, B.; MORRIS, G. A.; HARDING,S. E .; MICHAELSEN,T. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells. **Glycobiology**, vol. 18, n. 12, p. 1074-1084, 2008

ISMAIL, N. S. M.; RAMLI, N.; HANI, N. M.; MEON, Z. Extraction and characterization of pectin from dragon fruit **(***Hylocereus polyrhizus***)** using various extraction conditions. **Sains Malaysiana**, vol. 41, n. 1, p. 41-45, 2012.

JAIN, N.; JAIN, R.; JAIN, V.; JAIN, S. A review on: *Abelmoschus esculentus*. **Pharmacia**, vol. 1, n. 3, p. 84-89, 2012.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologis: O sistema imune na saúde e na doença.** Artmed editora, São Paulo, 5ª Edição. 2002.

JANI, G. K.; SHAH, D. P.; PRAJAPATI, V. D.; JAIN, V. C. Gums and mucilages: Versatile excipients for pharmaceutical formulations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 4, n. 5, p. 308-322, 2009.

KAČURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVÁ, V.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, vol. 43, n. 2, p. 195-203, 2000.

KEEGSTRA, K. Plant cell walls. **Plant Physiology**, vol. 154, p. 483 - 486, 2010.

KELKAR G. M., INGLE, T. R.; BHIDE, B.V.J. Mucilages from okra. **Journal of Indian Chemical Society**, vol. 39, p. 557-558, 1962.

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

KHOMSUG, P.; THONGJAROENBUANGAM, W.; PAKDEENARONG, N.; SUTTAJIT, M.; CHANTIRATIKUL, P. Antioxidative activities and phenolic content of extracts from okra (*Abelmoschus esculentus* L.). **Research Journal of Biological Sciences**, vol. 5, n. 4, p. 310-313, 2010.

KISHIDA, E.; TOKUNARU, S.; ISHITANI, Y.; YAMAMOTO, M.; ORIBE, M.; IGUCHI, H.; KOJO, S. Comparison of the formation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 41, p.1598-1600, 1993.

KISHIDA, T.; FUKUI, H. Biochemical studies on the mucilage in foods: The mucilage in okra (*Hibiscus esculentus*). **Kaseigaku Zasshi**, vol. 18, n. 17, p. 71-74, 1967.

KITAZAWA, K.; TRYFONA, T.; YOSHIMI, Y.; HAYASHI, Y.; KAWAUCHI, S.; ANTONOV, L.; TANKA, H.; TAKAHASHI, T.; KANEKO, S.; DUPREE, P.; TSUMURAYA, Y.; KOTAKE, T. β-Galactosyl Yariv reagent binds to the *β*-1,3-Galactan of arabinogalactan proteins. **Plant Physiology**, vol. 161, p. 1117-1126, 2013.

KONG, F.; ZHANG, M.; LIAO, S.; YU, S.; CHI, J.; WEI, Z. Antioxidant activity of polysaccharide-enriched fractions extracted from pulp tissue of *Litchi chinensis* Sonn. **Molecules**, vol. 15, p. 2152-2165, 2010.

KOUAKOU, K.; SCHEPETKIN, I. A.; JUN, S.; KIRPOTINA, L. N.; YAPI, A.; KHRAMOVA, D. S.; PASCUAL, D. W.; OVODOV, Y. S.; JUTILA, M. A.; QUINN, M. T. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Clerodendrum splendens*: Beneficial effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Complementary and Alternative Medicine**, vol. 13, p. 1-19, 2013.

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

KWAN J. S.; MORVAN, H. Characterization of extracellular ß(1,4)-xylan backbone *O*-substituted by arabinogalactans type II in a plant cell suspension. **Carbohydrate Polymers,** vol. 26, n. 2, p. 99-107, 1995.

KWON, R. H.; HA, B. J. Increased flavonoid compounds from fermented *Houttuynia cordata* using isolated six of bacillus from traditionally germented *Houttuynia cordata*. **Toxicology Research**, vol. 28, n. 2, p. 117-122, 2012.

LEE, K. J. D.; SAKATA, Y.; MAU, S. L.; PETTOLINO, F.; BACIC, A.; QUATRANO, R. S.; KNIGHT, C. D.; KNOX, J. P. Arabinogalactan-proteins are required for apical cell extension in the moss physcomitrella patens. The Plant Cell, vol. 17, p. 3051-3065, 2005.

LENGSFELD, C.; TITGEMEYER, F.; FALLER, G.; HENSEL, A. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 1495-1503, 2004.

LENZI, R. M. **Análise química e avaliação da atividade imunomoduladora de frações aquosas obtidas a partir de preparações comerciais de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D. C.** 163 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

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

LÉVÊQUE, C. **A biodiversidade**. Bauru: Editora da Universidade Sagrado Coração, 1999.

LIAO, H.; DONG, H.; SHI, W.; YUAN, K. Analysis and comparison of the active components and antioxidant activities of extracts from *Abelmoschus esculentus* L. **Pharmacognosy Magazine**, vol. 8, n. 30, p. 156-161, 2012.

LIMA, G. J. A. **Uso de polímero natural do quiabo como auxiliar de floculação e filtração em tratamento de água e esgoto**. 154 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

LIN, J. Y.; SEGUIN, R.; KELLER, K.; CHADEE, K. Tumor Necrosis Factor Alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. **Infection and Immunity**, vol. 62, n. 5, p. 1534-1541, 1994.

LINA, L.; PING, Z.; YAQI, C.; SHIFEN, M. High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection for simultaneous determination of monosaccharides and uronic acids. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, vol. 34, n. 10, p. 1371-1374, 2006.

LUCAS, E. F; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros: Determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: Editora E-pappers, 2001.

LUO, A.; GE, Z.; FAN, Y.; LUO, A.; CHUN, Z.; HE, X. J. *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium denneanum*. **Molecules**, vol. 16, p. 1579-1592, 2011.

LYSIAK, J. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. **Reproductive Biology and Endocrinology,** *vol.* 2, n. 9, p. 1-10, 2004.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, vol. 1, n. 6, p. 441-445, 1987.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MELLINGER, C. G.; CIPRIANI, T. R.; NOLETO, G. R.; CARBONERO, E. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 43, p. 115-120, 2008.

MELLO-FILHO, A. C.; HOFFMANN, E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1984.

MENG, L. Z.; LV, G. P.; HU, D. J.; CHEONG, K. L.; XIE, J.; ZHAO, J.; LI, S. P. Effects of polysaccharides from different species of *Dendrobium* (*Shihu*) on macrophage function. **Molecules**, vol. 18, n. 5, p. 5779-5791, 2013.

MICHELI, F. Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. **TRENDS in Plant Science**, vol.6, n .9, p. 414-419, 2001.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, vol. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.

MONTEIRO, N. K. **Caracterização estrutural de polissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium***. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, P. M.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. **Química Nova**, vol. 32, p. 327-331, 2009.

MORAIS, S. M.; CATUNDA-JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. S.; STONE, J.; NETO, M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, vol. 29, n. 5, p. 907-910, 2005.

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

MORETÃO, M. P.; BICHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, vol. 89, n. 2-3, p. 175-185, 2003.

MORRIS, G. A.; RALET, M. C.; BONNIN, E.; THIBAULT, J. F.; HARDING, S. E. Physical characterization of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. **Carbohydrate Polymers**, vol. 82, n. 4, p. 1161-1167, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, p. 55-63, 1983.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUES, M. SINEIRO, J.; DOMÍNGUES, H. NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-174, 2001.

NACIFE, V. P.; SOEIRO, M. N. C.; GOMES, R. N.; D'ÁVILLA, H.; CASTRO-FARIA NETO, H. C.; MEIRELLES, M. N. L. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide *in vivo*. **Cell Structure and Function,** vol. 29, n. 2, p. 27-34, 2004.

NAFICE, V. P.; SOEIRO, M. N. C.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO-FARIA NETO, H. C.; MEIRELLES, M. N. L. Ultrastructural, immunocytochemical and flow cytometry study of mouse peritoneal cells stimulated with carrageenan. **Cell Structure and Function**, vol. 25, n. 6, p. 337-350, 2000.

NDJOUENKEU, R.; AKINGBALA, J. O.; OGUNTIMEIN, G. B. Emulsifying properties of three African food hydrocolloids: okra (*Hibiscus esculentus*), dika nut (*Irvingia gabonensis*), and khan (*Belschmiedia* sp.). **Plant Foods for Human Nutrition**, vol. 51, p**.** 245-255, 1997.

NEGARD, C. S.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T. E.; MALTERUD, K. E.; KIYOHANA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S.. Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 91, p. 141-152, 2004.

NGOC, T. H.; NGOC, Q. N.; VAN, T. T.'PHUNG, N. V. Hypolipidemic effect of extracts from *Abelmoschus esculentus* L. (Malvaceae) on tyloxapol-Induced hyperlipidemia in mice. **Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 35, n. 1-4, p. 42-46, 2008.

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

O'NEIL, M, A.; WARRENFELTZ, D.; KATES, K.; PELLERIN, P.; DOCO, T.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, n. 37, p. 22923-22930, 1996.

OCHOA-VILARREAL, M.; AISPURO-HERNÁNZER, E.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A.; VARGAS-ARSPURO, I. Plant cell wall polymers: Function, structure and biological activity of their derivatives. In: GOMES, A. S. **Polymerization**. Editora inTech, 2012. p. 63-83.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation research**, vol. 386, n. 1, p. 39-67, 1997.

OLIVEIRA, A, M. F.; PINHEIRO, L. S.; PEREIRA, C. K. S.; MATIAS, W. N.; GOMES, R. A.; CHAVES, O. S.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; ASSIM, T. S. Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. **Antioxidants**, vol. 1, n. 1, p. 33-43, 2012.

OLIVEIRA, Y. L. B. **Atividade antioxidante e imunomoduladora de polissacarídeos de *Abelmoschus esculentus* L. Moench**. 19 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade positivo, Curitiba, 2011.

OSAKU, C. A.; SASSAKI, G. L.; ZANCAN, G. T.; IACOMINI, M. Studies on neutral exopolysaccharides produced by the ectomycorrhiza *Thelephora terrestris*. **Federation of European Microbiological Societies**, vol. 21, n. 2, p. 145-149, 2002.

OVODOV, Y. S. Current views on pectin substances. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, vol. 35, n. 3, p. 269-284. 2009.

OWEN, J. A.; PUNT, J. STRANFORD, S. A. **Kuby: Immunology**. Ed. W. H. Freeman and Company, 7ª Edição, 2013.

OWOLARAFE, O. K.; SHOTONDE, H. O. Some physical properties of fresh okro fruit. **Journal of Food Engineering**, vol. 63, p. 299-302, 2004.

PARIHAR, A.; EUBANK, T. D.; DOSERFF, A. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. **Journal of Innate Immunity,** vol. 2, p. 204-215, 2010.

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

PAULSEN, B. S.; BARSETT, H. Bioactive pectic polysaccharides. **Advances in Polymer Science**, vol. 1986, p. 69-101, 2005.

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

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.** ESALQ/USP, p. 01-26, 2004.

PÉREZ, S.; MAZEAU, K. Conformations, structures, and morphologies of celluloses. In: DEKKER, M. **Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility**. Editora Severian Dumitriu, 2ª Edição, 2005. p. 41-68.

PÉREZ, S.; MAZEAU, K.; PENHOAT, H. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 32, n. 1/2, p. 37-55, 2000.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for cell viability. In: KRUSE-JUNIOR, P. F.; PATTERSON, Jr. M. K. **Tissue culture: methods and application**. Academic Press, 1973. p. 406-408.

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

POPA. C.; NETEA, M. G.; VAN RIEL, C. M.; VAN DER MEER, W. M.; STALENHOEF, F. H. The role of TNF-α in chronic inflammatory condition, intermediary metabolism and cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research**, vol. 48, p. 751-762, 2007.

PORTILLO, J. A.; FELICIANO, L. M.; OKENKA, G.; HEINZEL, F.; SUBAUSTE, M. C.; SUBAUSTE, C. S. CD40 and tumor necrosis factor-a co-operate to up-regulate inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **British Society for Immunology**, vol. 135, n. 2, p. 140-150, 2012.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, vol. 269, p. 337-341, 1999.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, vol. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

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**, vol. 55, n. 6, p. 803-808, 1998.

REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, vol. 3, n. 7, p. 125-131, 2008.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, vol. 57, p. 929-967, 2001.

RIEDE, L.; GRUBE, B.; GRUENWALD, J. Larch arabinogalactan effects on reducing incidence of upper respiratory infections. **Current Medical Research & Opinion**, vol. 29, n. 3, p.251-258, 2013.

RIMBACH, G.; PARK, Y. C.; GUO, Q.; MOINI, H.; QURESHI, N.; SALIOU, C.; TAKAYAMA, K.; VIRGILI, F.; PACKER, L. Nitric oxide synthesis and TNF- α secretion in RAW 264.7 macrophages: Mode of action of a fermented papaya preparation. **Life Science,** vol. 61, n. 6, p. 679-794, 2000.

RIVELLI, D. O. **Biodisponibilidade, distribuição tecidual e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado**. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ROMA. International Crop Network Series. 5. Report of an International Workshop on Okra Genetic Resources. In: **International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR**), 1991.

RUMYANTSEVA, N. Y. Arabinogalactan Proteins: Involvement in plant growth and morphogenesis**.** **Biochemistry**, v.70, n.10, p.1073-1085, 2005.

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

SABITHA, V.; RAMACHANDRAN, S.; NAVEEN, K. R.; PANNEERSELVAM, K. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. In streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Pharmacy e BioAllied Sciences**, vol. 3, n. 3, p. 397-402, 2011.

SABITHA, V.; RAMACHANDRAN, S.; NAVEEN, K.; PANNEERSELVAM, K. Investigation of *in vivo* antioxidant property of *Abelmoschus esculentus* (L) Moench fruit seed and peel powders in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, vol. 3, n. 4, p. 188-193, 2012.

SANTA, H. S. D. **Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo em estado sólido**. 192 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. TLC OF CARBOHYDRATES. In: WAKSMUNDKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Taylor e Francis Group, 2008. p. 255-276.

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

SAVELLO, P. A.; MARTIN, F. W.; HILL, J. M. Nutritional composition of okra seed meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 28, n. 6, p. 1169-1166, 1980.

SCHELLER, H. V. e ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 61, p. 263-289, 2010.

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

SCHEPETKIN, I. A.; XIE, G.; KIRPOTINA, L. N.; KLEIN, R. A.; JUTILA, M. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides. **International Immunopharmacology,** vol. 8, n. 10, p. 1455-1466, 2008.

SÉNÉ, C. F. B.; MCCANN, M. C.; WILSON, R. H.; CRINTER, R. Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform infrared spectroscopy: An investigation of five higher plant cell walls and their components. **Plant Physiology**, vol. 106, n. 4, p. 1623-1631, 1994.

SENGKHAMPARN, N.; BAKX, E. J.; VERHOEF, R.; SCHOLS, H. A.; SAJJAANANTAKUL, T.; VORAGEN, A. G. J. Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and alpha-linked galactosyl groups. **Carbohydrate Research**, vol. 344, p. 1842-1851, 2009b.

SENGKHAMPARN, N.; VERHOEF, R., SCHOLS, H. A., SAJJAANANTAKUL, T., VORAGEN, A. G. J Characterization of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). **Carbohydrate Research**, vol. 344, p. 1824-1832, 2009a.

SHEU, S. C.; LAI, M. H. Composition analysis and immuno-modulatory effect of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) extract. **Food chemistry**, vol. 134, n. 4, p. 1906-1911, 2012.

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

SHUI, G.; PENG, L. L. An improved method for the analysis of major antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn. **Journal of Chromatography A**, vol. 1048, n. 1, p. 17-24, 2004.

SILA, D. N.; BUGGENHOAUT, V.; DUVETTER, T.; FRAEYE, I.; ROECK, A.; LOEY, V.; HENDRICKX. Pectins in processed fruits and vegetables: Part II-Structure-Function Relationships. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 8, n. 2, p. 86-104, 2009.

SILVA, M. P. L.; ALMASSY-JUNIOR, A. A.; SILVA, F.; SILVA, M. Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas por comunidades rurais de Mutuípe-BA integrantes do “Projeto ervas”. **In**: Agricultura Familiar e Ruralidade, Cruz das Almas - Bahia. ***Palestras*...**Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2007, p. 1-12.

SILVA, V. S. N. **Estudo dos efeitos nutricionais da farinha de polpa e mucilagem extraída do quiabo (*Hibiscus esculentus* L.).** 135 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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

SMITH, H. **The Molecular Biology of Plant Cells**. University of California Press. Berkeley: University of California Press, 1977.

SOLECKI, R.S. Shanidar IV, a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq. **Science**, vol. 190, n. 4217, p. 880-881, 1975.

STOIKA, R. S.; LUTSIK, M. D.; BARSKA, M. L.; TSYRULNYK, A. A.; KASHCHAK, N. I. In vitro studies of activation of phagocytic cells by bioactive peptides. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v53, n.4, p.675-688, 2002.

STOOKEY, L. L. Ferrozine: A New Spectrophotometric Reagent for Iron. **Analytical Chemistry,** vol. 42, n. 779-781, 1970.

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

TAN, L.; EBERHARD, S.; PATTATHIL, S.; WARDED, C.; CLUSHKA, J.; YUAN, C.; HAO, Z.; ZHU, X.; AVCI, U.; MILLER, J. S.; BALDWIN, D.; PHAM, C.; ORLANDO, R.; DARVILL, A.; HAHN, M. G.; KIELISZEWSKI, M. J.; MOHNEN. An arabidopsis cell Wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. **The Plant cell**, vol. 25, n. 1, p. 270-287, 2013.

THOMAS, L. H.; FORSYTH, T.; ŠTURCOVÁ, A.; KENNEDY, C. J.; MAY, R. P.; ALTANER, C. M.; APPERLEY, D. C.; WESS, T. J.; JARVIS M. C. Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma. **Plant Physiology**, vol. 161, p. 465-476, 2013.

THYGESEN, L. G.; LØKKE, M. M.; MICKLANDER, E.; ENGELSEN, S. B. Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 14, p. 50-57, 2003.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto** & **Contexto Enfermagem**, vol. 15, n.1, p. 115-121, 2006.

TOMODA, M., SHIMADA, K.; SAITO, Y.; SUGI, M. Plant mucilages. XXVI. Isolation and structural features of a mucilage, “okra-mucilage F”, from the immature fruits of *Abelmoschus esculentus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 28, n. 10, p. 2933-2940, 1980.

TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; GONDA, R.; KANARI, M. Anticomplementary and hypoglycemic activity of Okra and Hibiscus mucilages. **Carbohydrate Research**, vol. 190, n. 2, p. 323-328, 1989.

TONGJAROENBUANGAM, W.; RUKSEE, N.; CHANTIRATIKUL, P.; PAKDEENARONG, N.; KONGBUNTAD, W.; GOVITRAPONG, P. Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. **Neurochemistry International**, vol. 59, p. 677-685, 2011.

UPRETY, Y.; ASSELIN, H.; DHAKAL, A.; JULIEN, N. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. vol. 8, n. 7, p. 2-14, 2012.

URAKU, A. J.; ONUOHA, S. C.'OFFOR, C. E.; OGBANSHI, M. E.; NDIDI, U. S. The effects of *Abelmoschus esculentus* fruits on ALP, AST and ALT of diabetic albino rats. **International Journal of Science and Nature**, vol. 2, n. 3, p. 582-586, 2011.

URIAS-ORONA, V.; RASCÓN-CHU, A.; LIZARDI-MENDONZA, J.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; GARDEA, A. A.; RAMÍREZ-WONG, B. A novel pectin material: extraction, characterization and gelling properties. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 11, p. 3686-3695, 2010.

VAN DEN BROEK, R.; IACOVINO, G. D.; PARADELA, A. L.; GALLI, M. A. Controle alternativo de oídio (*Erysiphe cichoracearum*) em quiabeiro (*Hibiscus esculentum*). **Revista Escossistema**, vol. 27, n.1, p. 23-26, 2002.

VAN HOLST, G. J.; CLARKE, A. E. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. **Analytical Biochemistry**, v. 148, n. 2, p. 446-50, 1985.

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

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, vol. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

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

VRIESMANN, L. C. **Extração, caracterização e aspectos reológicos de polissacarídeos da polpa dos frutos de *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçu).** 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; OLIVEIRA-PETKOWICZ, C. L. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, vol. 84, n. 4, p. 123001236, 2011.

VWIOKO, E. D.; OSAWARU, M. E.; ERUOGUN, O, L. Nickel and chromium concentrations in plant tissues of accessions of Okro (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench.) grown in soil contaminated with paint waste. **African Journal of General Agriculture**, vol. 4, n. 1, p.27-37, 2008.

WHISTLER, R.; CONRAD, H. E. 2-*O*-(D-Galactopyranosyluronic acid)-L-rhamnose from okra mucilage. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 76, n. 13, p. 3544-3546, 1954b.

WHISTLER, R.; CONRAD, H. E. Crystalline galactobiose from acid hydrolysis of okra mucilage. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 76, n. 6, p. 163-1674, 1954a.

WINNING, H; VIERECK, N; NØRGAARD, L; LARSEN, J; ENGELSEN, S.B. Quantification of the degree of blockiness in pectins using 1H NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Hydrocolloids**, vol. 21, n. 2, p. 256-266, 2007.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York: Academic Press, 2, 211-215. 1963b.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York: Academic Press, 2, 65-68. 1963a.

WOOLFE, M. L.; CHAPLID, M. F.; OTCHERE, G. Studies on the mucilages extracted from okra fruits *(Hibiscus esculentus* L.) and baobab leaves *(Adansonia digitata* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture,** vol. 28, n. 6, p. 519-529, 1977.

WU, H.; HYMOWITZ, S. G. Structure and function of tumor necrosis factor (TNF) at the cell surface.In: BRASDHAW, R. A.; DENNIS, E. A. **Handbook of Cell Signaling**. 2ª Edição. Oxford: Academic Press, 2009, pp. 265-275.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. H.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIIKARI, L. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. In: DEKKER, M. **Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility**. Editora Severian Dumitriu, 2ª Edição, 2005. p. 995-1033.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. International Immunopharmacology, vol. 7, n. 13, p. 1639-1650, 2007.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A.; SIEMSEN, D. W.; KIRPOTINA, L. N.; WILEY, J. A.; QUINN, M. T. Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartite*. **Phytochemistry**, vol. 69, n. 6, p. 1359-1371, 2008.

XU, D. J.; XIA, Q.; WANG, J. J.; WANG, P. P. Molecular weight and monosaccharide composition of *Astragalus* polysaccharides. **Molecules**, vol. 13, n. 10, p. 2408-2415, 2008.

YAPO, B. M. Rhamnogalacturonan-I: A Structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. **Polymer Reviews**, vol. 51, p. 391-413, 2011.

YI, Y.; LIAO, S. T.; ZHANG, M. W.; SHI, J.; ZHANG, R. F.; DENG, Y. Y.; WEI, Z. C. Physicochemical characteristics and immunomodulatory activities of three polysaccharide-protein complexes of longan Pulp. **Molecules**, vol. 16, n. 7, p. 6148-6164, 2011.

ZAVASCKI, A. P; GOLDANI, L. Z.; LI, J.; NATION, R. L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: A critical review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 60, p. 1206-1215, 2007.

ZHAO, Y.; SON, Y. O.; KIM, S. S.; JANG, Y. S.; LEE, J. C. Antioxidant and Anti-hyperglycemic Activity of Polysaccharide Isolated from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. 40, N. 5, p. 670-677, 2007.

# ANEXOS

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

**Nº 683**

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 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 da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **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 CEUA 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**: 23075.004353/2013-33 **APROVADO**: 23/05/2013 – R.O. 04/2013

**TÍTULO:** Caracterização estrutural de polissacarídeos provenientes dos frutos de *Abelmoschus esculentes* L. Moench e duas atividades biológicas *in vitro*

**AUTORES:** Juliana Bello Baron Maurer, Melina Seyfried, Andressa Soldera da Silva, Selma Faria Zawadzki-Baggio, Fabíola Regina Stevan-Hancke, Luciano Henrique Campestrini, Fábio Tomio Yamassaki, Thiago A. Cruz , Lew Sprenger, Marcelo Molento

DEPARTAMENTO: Bioquímica

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA