



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

SIMONE DA PAZ LEÔNICIO ALVES

Pectina de folhas de *Crataeva tapia*: isolamento, caracterização, atividade antioxidante e efeitos imunoestimuladores

RECIFE

2020

SIMONE DA PAZ LEÔNCIO ALVES

Pectina de folhas de *Crataeva tapia*: Isolamento, caracterização, atividade antioxidante e efeitos imunestimuladores

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de concentração: Morfologia e Inovações Tecnológicas

Orientador: Prof^ª. Dra. Ivone Antônia de Souza

Co-orientador: Dr. Alex Benício da Silveira

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo

RECIFE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Alves, Simone da Paz Leôncio

Pectina de folhas de *Crataeva tapia*: isolamento, caracterização, atividade antioxidante e efeitos imunoestimuladores / Simone da Paz Leôncio Alves – 2020.

102 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Ivone Antônia de Souza

Coorientadores: Alex Benício da Silveira e Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, 2020. Inclui referências e apêndices.

1. Plantas medicinais 2. Cicatrização de feridas 3. Linfócitos I. Souza, Ivone Antônia de (orient.) II. Silveira, Alex Benício da (coorient.) III. Melo, Cristiane Moutinho Lagos de (coorient.) IV. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-026

SIMONE DA PAZ LEÔNCIO ALVES

Pectina de folhas de *Crataeva tapia*: isolamento, caracterização, atividade antioxidante e efeitos imunoestimuladores

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Marta Gerusa Soares de Lucena (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

A Deus inicialmente, por se fazer presente em todas as horas de minha existência terrestre me ajudar a levantar quando porventura viesse a cair.

Aos meus pais, Milton (*in memoriam*) e Ilma. (*in memoriam*), por todos os esforços realizados para que eu alcançasse meus objetivos. Aos meus familiares, esposo, filhas, netos e genros pelo apoio, carinho e paciência que tiveram até o final dessa jornada. Tudo que faço é por vocês.

As minhas amigas e irmãs de coração Altair e Alice pelo apoio, incentivo e carinho nos momentos difíceis.

Aos meus colegas de trabalho Alex, Márcia, Solange e Viviane por me ensinarem como é bom ter alguém para dividir os momentos de dificuldade nessa jornada aqui na Terra.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza, por ter acreditado e não ter desistido de mim em nenhum momento, ter investido e acreditado no meu trabalho durante todo trajeto percorrido. Pela paciência, boa vontade, carinho e amizade no decorrer desse tempo, meu imensurável agradecimento.

Aos meus Co-orientadores Dr. Alex Benício da Silveira e Profa. Dra. Cristiane Moutinho, por toda preocupação, esclarecimentos e boa vontade que me auxiliaram na conclusão desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia (UFPE), pela oportunidade de realização do mestrado. Aos professores do Programa, que compartilharam comigo o seu conhecimento e a toda equipe de secretária por terem sido sempre tão solícitos em sanar minhas dúvidas e facilitar o percurso.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da UFPE que tanto me apoiaram nesta caminhada. Em especial a companheira Marcela por todas as dicas e orientações.

Ao Dr. Iranildo José da Cruz Filho do Departamento de Antibióticos da UFPE, meus sinceros agradecimentos por toda orientação e apoio nessa jornada.

As minhas tias Bibi, Vilma e Ângela que me apoiaram e acolheram durante todos os Congressos que fiz parte no Estado da Paraíba.

As professoras do LIACLI, Profa. Dra. Ana Beatriz, Profa. Dra. Betânia e Profa. Dra. Daniele, pelas orientações e apoio e incentivo.

Aos meus colegas de turma que muito me apoiaram e me incentivaram, em especial a Mayza por toda ajuda a mim disponibilizada, principalmente nos momentos finais dessa trajetória.

Ao meu amado irmão caçula, Marlos Leôncio por todo apoio, carinho e amor a mim dispensados, minha eterna gratidão e admiração.

A toda minha família que torce diariamente pelo meu sucesso. Que sempre foram grandes incentivadores dos meus sonhos, obrigada pela paciência, pelos incansáveis telefonemas e todas as orações intencionadas a mim ao longo desta caminhada. Amo vocês!

Aos amigos que sempre estiveram presentes e a aqueles que fiz no decorrer desse percurso, obrigada por todos os risos e momentos de descontração, além do apoio e companheirismo a mim dedicado.

Ao meu grande amor, companheiro, confidente e apoio de todas as horas e momentos, Edvaldo Francisco. Obrigada, por ser sempre o meu grande motivador, meu aconchego e minha calma.

“A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado.

Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida,

lembrando que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser”

Chico Xavier.

RESUMO

Embora muitas plantas tenham seu valor medicinal reconhecido, que está em constante comprovação científica, a cultura popular colabora com o uso indiscriminado de plantas medicinais no contexto da automedicação, exigindo o estudo de seus constituintes, o mecanismo de ação terapêutica e a identificação de princípios ativos responsáveis pelas diversas atividades biológicas relatadas pela população (FORD *et al.*, 2014). Neste contexto temos a família Capparidaceae cujas espécies têm amplas propriedades terapêuticas. No nosso estudo, destacamos a *C. tapia*, que diferente das outras espécies da família Capparaceae, obtivemos o processo de extração de pectina a partir das folhas, o que ainda não havia tido relatos na literatura de seus efeitos terapêuticos divulgados à comunidade Científica. *Crataeva tapia* é uma espécie arbórea encontrada no semiárido brasileiro, na vegetação da Caatinga em áreas de rochas cristalinas, em áreas sedimentares e em matas ciliares. Pertence à Ordem Brassicales, Família Capparaceae (LORENZI, 2008; APG III, 2009; MORO, 2014). Objetivo: Este estudo visou isolar a pectina das folhas de *Crataeva tapia*, ainda não relatada na literatura e avaliou seu perfil antioxidante, citotóxico e imunomodulador. Metodologia: A pectina das folhas da *Crataeva tapia*, foi extraída em três etapas, solvente orgânico seguido de água acidificada e precipitação em etanol. Com a pectina obtida, foram realizadas análises composicionais e espectroscópicas (ATR / FTIR e ¹H NMR), foram realizadas então as atividades antioxidantes (DPPH, ABTS, TAA e NO), além de avaliadas *in vitro* as atividades citotóxicas, imunomoduladora e imunofenotipagem (análise por citometria de fluxo) em cultura de PBMC. Resultados: as análises físicas e químicas mostraram sinais característicos de pectina de baixo teor de ácido galacturônico ($37 \pm 1,0\%$) e conteúdo de cinzas ($1,5 \pm 0,0\%$) e umidade ($6,75 \pm 0,1$). Os testes de atividade antioxidante mostraram que a pectina apresentou capacidade moderada para o Testes ABTS, DPPH, TAA e NO, $41,16 \pm 0,30$, $25,9 \pm 0,01$ e $20,4 \pm 0,2$ e $7,6 \pm 1,9\%$ na concentração de 0,5 mg / mL, respectivamente. Além disso, a pectina não afetou a viabilidade da cultura de PBMC nas concentrações em estudo (2,5 a 80 µg / mL), sendo também capaz de promover a produção de citocinas IL-6, IL-10 e TNF-α e induzir a ativação de uma resposta CD8 + significativa. Conclusão: Este estudo mostrou que a pectina de *Crataeva tapia* é um potencial agente terapêutico devido às suas diferentes atividades antioxidantes e biológicas, promovendo um perfil pró-inflamatório em culturas de PBMC humanas.

Palavras-chave: Perfil pró-inflamatório. Linfócito T citotóxico (CD8 +). Cicatriz

ABSTRACT

Although many plants have their medicinal value recognized, which is in constant scientific evidence, popular culture collaborates with the indiscriminate use of medicinal plants in the context of self-medication, requiring the study of their constituents, the mechanism of therapeutic action and the identification of active principles responsible for the various biological activities reported by the population (FORD *et al.*, 2014). In this context, we have the Capparidaceae family, whose species have broad therapeutic properties. In our study, we highlight *C. tapia*, which, unlike other species of the Capparaceae family, obtained the process of extracting pectin from the leaves, which had not yet been reported in the literature of its therapeutic effects disclosed to the Scientific community. *Crataeva tapia* is a tree species found in the Brazilian semiarid, in the Caatinga vegetation in areas of crystalline rocks, in sedimentary areas and in riparian forests. It belongs to the Order Brassicales, Family Capparaceae (LORENZI, 2008; APG III, 2009; MORO, 2014). **Objective:** This study aims to isolate a pectin from *Crataeva tapia* leaves, not yet reported in the literature, and to evaluate its antioxidant, cytotoxic and immunomodulatory profile. **Methodology:** The pectin was extracted from the leaves in three stages, organic solvent followed by acidified water and precipitation in ethanol. With the pectin obtained, compositional and spectroscopic analyzes (ATR / FTIR and ¹H NMR) were performed, then the antioxidant activities (DPPH, ABTS, TAA and NO) were evaluated in vitro, cytotoxic, immunomodulatory and immunophenotyping (analysis by cytometry of flow) in PBMC culture. **Results:** the physical and chemical analyzes showed characteristic signs of pectin, low content of galacturonic acid ($37 \pm 1.0\%$), and ash contents ($1.5 \pm 0.0\%$) and moisture (6.75 ± 0.1). The antioxidant activity tests showed that pectin showed moderate antioxidant capacity for the ABTS, DPPH, TAA and NO tests, 41.16 ± 0.30 , 25.9 ± 0.01 and 20.4 ± 0.2 and $7.6 \pm 1.9\%$ in a concentration of 0.5 mg / mL, respectively. Furthermore, pectin did not affect the viability of the PBMC culture at the concentrations under study (2.5 to 80 μg / mL). In addition, it was able to promote the production of cytokines IL-6, IL-10 and TNF- α and induced the activation of a significant CD8 + response. **Conclusion:** This study showed that *Crataeva tapia* pectin is a potential therapeutic agent due to its different antioxidant and biological activities, promoting a pro-inflammatory profile in human PBMC cultures.

Keywords: Proinflammatory profile. Cytotoxic T lymphocyte (CD8 +). Healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Imunidade Inata e Adaptativa.....	21
Figura 2-	Eventos Leucocitários da Inflamação.....	21
Figura 3-	Cascata do Ácido Araquidônico.....	21
Figura 4-	Resposta inflamatória.....	24
Figura 5-	Formação de Radicais livres e Antioxidantes.....	27
Figura 6-	Mecanismo de reação entre o DPPH e um Antioxidante.....	29
Figura 7-	Detalhes da Planta <i>Crataeva tapia</i>	34
Figura 8-	Fruto da <i>Crataeva tapia</i>	34
Figura 9-	Estrutura da Parede Celular.....	41
Figura 10-	Três camadas de parede secundária.....	44
Figura 11-	Localização da Pectina na Celular.....	44
Figura 12-	Arquitetura das Paredes Celulares tipo I e II.....	45
Figura 13-	Estrutura Geral da Pectina.....	48
Figura 14-	Ligações do Ácido Galacturônico.....	49
Figura 15-	Homogalacturonanas, RGI, RGII.....	49
Figura 16-	Alternativa da Cadeia Pécica.....	50
Figura 17-	Estrutura da Pectina.....	50
Figura 18-	Representação Esquemática da Pectina.....	51
Figura 19-	Principais modificações nas substâncias pécticas por efeito de temperatura.....	54
Figura 20-	Estrutura do ácido Galacturônico.....	55
Figura 21-	Diagrama mostrando os principais componentes do Espectrofotômetro.....	56
Figura 22-	Esquema da estrutura química do DPPH e reação com Antioxidante.....	60
Figura 23-	Mecanismo de reação envolvido no Método de Griess.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Teor de Pectina em Matéria Seca de Principais Frutas Utilizadas na Extração.....	42
Tabela S1 -	Antioxidant activity of pectina at concentrations of 500µg/mL.....	69

LISTAS DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Viabilidade de PBMCs em humanos tratados com pectina de folhas de *C. tapia* em diferentes concentrações. A pectina não promoveu morte celular significativa. As barras verticais representam a média de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata..... 71
- Gráfico 2- Efeito imune estimulador da pectina de folhas de *C. tapia* em culturas de PBMCs humanas em 24 h de incubação. Barras verticais representam a média de duas experiências independentes realizadas em quadruplicado..... 72
- Gráfico 3- Ativação dos subconjuntos de linfócitos T CD4 + e T CD8 + pela pectina das folhas de *C. tapia*. A contagem total de linfócitos mostrou que o subconjunto de linfócitos T CD8 + tem um valor mais alto em comparação às células de controle ($p = 0,0468$). Barras verticais representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicado..... 72

LISTA DE SIGLAS

AGP	Arabinogalacturonana Proteínas
APCs	Células apresentadoras de Antígenos
ARA	Arabinana
ARA I	Arabinogalactana I
ARA II	Arabinogalactana II
ATM	Alto teor de Metoxilação
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CE 50	Concentração Eficiente em 50%
D- xylp	Xilose
D-Glcp	Glucose
D-Mamp	Manose
DPPH	2,2- Diphenil-1-picrylhydrazyl
FDA	Food and Drug Administration
FEH	Fator Estimulantes dos Hepatócitos
FNT	Fator de Necrose Tumoral
GALp	Galacturonana
GM	Grau de Metoxilação
HG	Homogalacturonana
HM ou AM	Alta Metoxilação
IC-50	Concentração Inibitória 50%
IgG2	Imunoglobulina G2
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4

IL-6	Interleucina 6
LDH	Lactato Desidrogenase
LM ou BM	Baixa metoxilação
LTs	Leucotrienos
PGE2	Eicoisanóides
RGI	Ramnogalacturonana I
RGII	Ramnogalacturonana II
T reg	Células T reguladoras
Th2	T help 2
TNF- α	Fator de Necrose tumoral Alfa
XGA	Xilogalacturonana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1	IMUNOMODULAÇÃO.....	20
3.1.1	Atividade Imunomoduladora das Plantas Medicinais.....	23
3.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	25
3.2.1	Classificação dos Antioxidantes.....	25
3.2.2	Mecanismos de Ação dos Antioxidantes.....	26
3.2.3	Atividade Antioxidante em Plantas Medicinais.....	27
3.3	CITOTOXICIDADE.....	29
3.4	PLANTAS MEDICINAIS.....	30
3.4.1	Plantas Medicinais no Brasil.....	31
3.4.2	Descrição botânica da <i>Crataeva tapia</i>.....	33
3.4.2.1	Tronco e casca.....	33
3.4.2.2	Folhas.....	33
3.4.2.3	Flor/influorescência.....	33
3.4.2.4	Frutas, sementes e síndrome de dispersão.....	34
3.4.3	Propriedades Terapêuticas da <i>Crataeva tapia</i>.....	35
3.4.3.1	Parede Celular Vegetal.....	35
3.4.3.2	Celulose e hemiceluloses.....	36
3.5	HISTÓRICO DAS PECTINAS.....	37
3.6	HISTÓRICO DA PRODUÇÃO COMERCIAL DA PECTINA.....	39
3.7	HISTÓRICO DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DA PECTINA.....	40
3.8	PECTINAS: NOMENCLATURA, FUNÇÃO E OCORRÊNCIA.....	40
3.9	PRINCIPAIS FONTES DE PECTINA.....	41
3.10	EXTRAÇÃO DE PECTINA.....	42
3.11	ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA PECTINA.....	44
3.11.1	Localização.....	44
3.11.2	Geleificação da pectina.....	45
3.11.3	Estrutura Molecular da Pectina.....	46
3.11.4	Características estruturais de pectinas e de polissacarídeos contendo arabinose e/ou galactose.....	46
3.11.4.1	Homogalacturonanas (HG).....	46
3.11.4.2	Ramnogalacturonanas tipo I.....	47
3.11.4.3	Ramnogalacturonanas tipo II.....	47
3.11.4.4	Apiogalacturonanas e xilogalacturonanas.....	47
3.11.4.5	Arabinanas.....	47
3.11.4.6	Arabinogalactanas tipo I (AG-I).....	47
3.11.4.8	Arabinogalactanas tipo II (AG-II) e arabinogalactana-proteínas.....	48

3.11.5	Estrutura Química das Pectinas.....	50
3.11.5.1	Propriedades físicas das Pectinas.....	52
3.11.5.2	Propriedades imunomoduladoras de pectinas e polissacarídeos contendo arabinose e galactose de plantas medicinais.....	52
5.11.5.3	Degradação das Pectinas.....	53
3.11.5.4	Caracterização de Substâncias Pécicas.....	55
3.11.5.5	Caracterização física da pectina.....	55
3.11.5.5.1	<i>Determinação do teor de cinzas e umidade.....</i>	<i>55</i>
3.11.5.5.2	<i>Teor de ácido galacturônico.....</i>	<i>55</i>
3.11.6	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier / refletância total atenuada (ATR / FTIR).....	56
3.11.6.1	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).	56
3.11.6.2	Grau de Acetilação.....	57
3.11.6.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (¹ H NMR).....	58
3.11.6.4	Potencial de Zeta.....	58
3.11.6.5	Reologia.....	58
3.11.6.6	Determinação dos Fenóis Totais.....	59
3.11.7	Testes de atividade antioxidante <i>in vitro</i>.....	59
3.11.7.1	Formação do complexo fosfomolibdênico.....	60
3.11.7.2	Atividade sequestrante de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)...	60
3.11.7.3	Atividade de eliminação do cátion do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico ácido (ABTS).....	61
3.11.7.4	Atividade de eliminação de radicais de óxido nítrico (NO).....	61
3.12	APLICAÇÕES DAS PECTINAS.....	62
3.13	PAREDE CELULAR VEGETAL.....	63
3.13.1	Celulose e hemiceluloses.....	63
3.13.2	Esterificação da pectina.....	65
4	MATERIAL E METODOS.....	66
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	66
4.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PECTINA: EXTRAÇÃO DE PECTINA.....	66
4.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PECTINA USANDO ATR-FTIR.....	66
4.4	ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	67
4.5	ENSAIOS CITOTÓXICOS E IMUNOLÓGICOS: PREPARAÇÃO, CULTURA E ESTIMULAÇÃO IN VITRO DE PBMCS.....	67
4.6	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE.....	68
4.7	MEDIÇÃO DE CITOCINAS E PRODUÇÃO DE NITRITOS.....	68
4.8	ENSAIO DE IMUNOFENOTIPAGEM.....	68
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1	ATIVIDADES ANTIOXIDANTES <i>IN VITRO</i>	69
5.1.1	Análise do espectro do FTIR e do RMN do ¹H.....	70

5.1.1.1	Espectro FTIR para a pectina das folhas de <i>Crataeva tapia</i>	70
5.1.1.2	Espectro de RMN de ¹ H para pectina extraída de folhas de <i>Crataeva tapia</i>	70
5.2	CITOTOXICIDADE.....	71
5.3	CITOCINAS, PRODUÇÃO DE NITRITOS E IMUNOFENOTIPAGEM.....	71
6	CONCLUSÃO.....	74
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APENDICE A - ARTIGO SUBMETIDO.....	91

1 INTRODUÇÃO

As plantas são importantes bancos de recursos naturais e exercem grande influência diretamente na sociedade contemporânea. Em particular, porque são métodos alternativos de tratamento de várias patologias humanas (YUAN *et al.*, 2016). Portanto, uma fonte variada de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais são modelos para a síntese de um grande número de medicamentos.

Cerca de 80% da população mundial faz uso da medicina tradicional, e destes, 85% utilizam as plantas medicinais para o controle e tratamento das mais diversas doenças (FENALTI *et al.*, 2016). Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (BARREIRO *et al.*, 2019).

Neste contexto destacamos a família Capparaceae ou Capparidaceae (Dicotyledonae), descrita por Antoine Laurent de Jussieu, que tem aproximadamente 46 gêneros e 650 espécies espalhadas nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo (SILVA, J.C.S *et al.*, 2020). A família apresenta distribuição pantropical, sendo notavelmente adaptada a habitats sazonalmente secos. Isso também se aplica ao domínio fitogeográfico da Caatinga, onde Capparaceae aparece como uma das principais famílias, tanto por possuir um número considerável de espécies, quanto por apresentar espécies de ampla distribuição (NETO, R. L.S *et al.* 2014).

Dentre estas destaca-se a *Crataeva tapia*, conhecida popularmente como catoré, cabaceira, cabaceira-do-pantanal e pau-d'alho (SOUSA, LUCAS DELANO NASCIMENTO., 2019). Estudos comprovaram que uma proteína isolada a partir da casca dessa espécie, apresentou propriedades biológicas como antiinflamatória, analgésica, antitumoral e com atividade inseticida (ZHANG *et al.*, 2013), sendo também utilizada como tônico, febrífugo e no combate das infecções do trato respiratório, devido as propriedades medicinais existentes em suas folhas, cascas e frutos (SHARMA *et al.*, 2013), sendo essas propriedades terapêuticas associadas a presença de compostos bioativos.

Esses compostos bioativos consistem em polissacarídeos estruturais, como celulose, lignina e pectina que são encontrados na parede celular. Esses três tipos são representados em quase todas as paredes celulares vegetais em proporções variadas, proporcionando maior ou

menor rigidez, dependendo de sua localização no corpo da planta (MOHNEN *et al.*, 2008). Dentre os compostos Bioativos encontrados, destaca-se a Pectina, que é um polissacarídeo, heterogêneo, aniônico, de cadeia linear formada, principalmente, por α -D-ácido galacturônico.

Este polímero é encontrado na parede celular primária e na lamela média dos vegetais, tendo a função de regular a adesão intercelular. é de relevante importância medicinal e nutracêutica, pois apresentam a capacidade de produzir géis ou soluções altamente viscosas. As pectinas estão presentes em diferentes partes do vegetal, como frutos, folhas, flores, raízes e sementes (SEYFRIED, 2016). São a matriz na qual as microfibrilas de celulose são incorporadas. As interações entre diferentes polissacarídeos garantem as propriedades fortes, porém dinâmicas e flexíveis da parede celular (HARHOLT *et al.*, 2010).

As concentrações mais elevadas de pectinas são encontradas nas cascas de frutas cítricas como a laranja e o limão, as quais são fontes naturais utilizadas mais comumente na indústria alimentícia e na indústria farmacêutica como excipiente na liberação de fármacos (SOUSA, E.A, O *et al*, 2020).

A pectina possui diversas aplicações sendo bastante utilizada pela indústria alimentícia e farmacêutica. A indústria de alimentos utiliza a pectina para o aumento da viscosidade dos alimentos, na produção de geleias e doces, na preparação de 16 bebidas e sucos de frutas concentrados, produtos derivados do leite gelificados ou fermentados. Também pode ser utilizada para prevenir a flotação em produtos derivados de frutas, garantir estabilidade proteica, além de proporcionar melhorias na textura e maciez do alimento junto ao aumento do volume (CANTERI *et al*, 2012).

Ainda de acordo com CANTERI *et al.* 2012), quanto aos efeitos farmacológicos, as substâncias pécticas atuam benéficamente no equilíbrio hídrico e na motilidade intestinal; auxiliam na redução do colesterol total, na quebra de frações do LDL (mau colesterol) não afetando no HDL (bom colesterol); diminuição do peso corporal devido a retenção de nutrientes nos intestinos, aumentando a saciedade e reduzindo a atividade de enzimas digestivas. Também impede a reabsorção de toxinas liberadas por metais pesados e microrganismos no colón e atua na indústria farmacêutica como excipiente na liberação de fármacos, (SEYFRIED, 2016).

As pectinas também estão envolvidas em muitos processos, tais como os relacionados a sinalização e à expansão celular (SEYFRIED *et al*, 2016). Esse estudo objetivou elucidar as

atividades imunomoduladora e a atividade antioxidante da Pectina extraída das folhas da *Crataeva tapia*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Análisar a Pectina isolada das folhas da *Crataeva tapia*, quanto ao seu potencial antioxidante, citotóxico e Imunomodulador.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e Identificar o material botânico
- Preparar o extrato hidroalcolico das folhas da *Crataeva tapia*.
- Avaliar o perfil Fitoquímico das Folhas da *Crataeva tapia*.
- Extrair a Pectina das Folhas da *Crataeva tapia*.
- Avaliar a atividade Antioxidante da Pectina extraída das Folhas da *Crataeva tapia*.
- Avaliar o potencial Imunomodulador da Pectina extraída das Folhas da *Crataeva tapia*.
- Realizar os ensaios de Imunofenotipagem da Pectina extraída das folhas da *Crataeva tapia*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

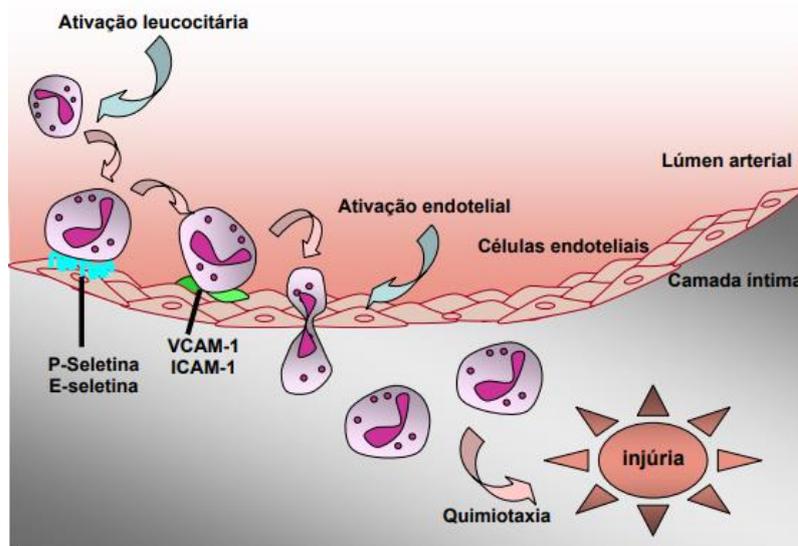
3.1 IMUNOMODULAÇÃO

O sistema imunológico é constituído por uma intrínseca rede de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostasia do organismo, combatendo as agressões em geral. A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. Os Macrófagos possuem grande importância no sistema imune inato, no qual inicialmente funcionam como a primeira linha de defesa por iniciar a resposta inflamatória em resposta à exposição ao antígeno, participando da fagocitose e morte intracelular de microrganismos. Além disso, contribuem para o reparo de tecidos e agem como células apresentadoras de antígenos, que são requeridas para a indução de respostas imunes específicas. Desta forma, a inibição da ativação de macrófagos é uma das abordagens possíveis para a modulação do processo inflamatório (VIEIRA, N.A *et al*, 2014).

A inflamação é um processo fisiológico acionado sempre que um agente agressor físico, químico ou biológico, que ultrapassa a barreira de defesa do corpo humano. Este processo tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação de diversos mediadores específicos e não específicos da imunidade (SILVA, S.C *et al*, 2015). Quando esse balanço entre inflamação e restauração tecidual é quebrado, ocorre o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes, tais como lupus eritematoso sistêmico (SILVA, S.C, 2015).

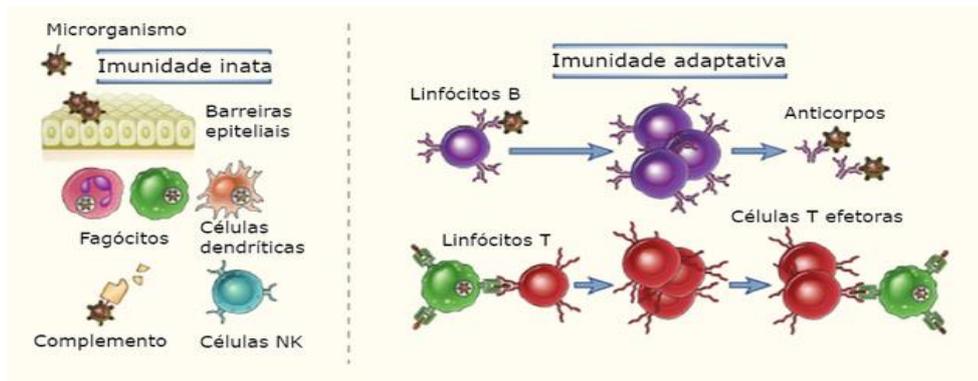
A via do ácido araquidônico é um importante via imunomoduladora, uma vez que os eicosanoides (PGE2) e leucotrienos (LTs) modulam de maneira direta o processo inflamatório e a resposta imune celular, inibindo a ação fagocítica dos macrófagos, a atividade das APCs (células apresentadoras de antígenos) e produção de citocinas pró inflamatórias como a IL-2, IL-12 e induzindo a síntese de IL-10. Assim essas citocinas secretadas por diferentes grupos de células como Th2, células T reguladoras (Treg), macrófagos, linfócitos B e células dendrites modulam o sistema imunológico, promovendo o equilíbrio imunológico (SILVA, S.C, 2015).

Figura 1- Imunidade Inata e Adaptativa.



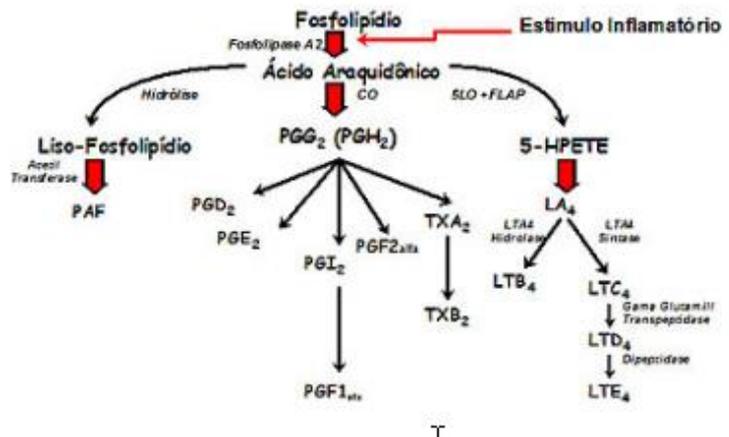
Fonte: DIANA, J., 2019.

Figura 2- Eventos Leucocitários da inflamação



Fonte: SOUZA, W. M., 2008.

Figura 3- Cascata do Ácido Araquidônico



Fonte: TELLES FILHO, P. A., 2020.

Nas fases iniciais do processo de inflamação tissular, os monócitos mobilizados no nível tissular e os sistêmicos ativados ou recirculantes produzem monocinas, das quais as mais claramente implicadas são o IL-1 e o fator de necrose tumoral (FNT), o IL-6 e o fator estimulante dos hepatócitos (FEH). Logo os níveis séricos de cortisol aumentam, chegando a taxas muito elevadas em cerca de seis horas; a quantidade de neutrófilos circulantes começa a aumentar e chega ao máximo dez horas depois. Uma grande quantidade de leucócitos se associa fracamente com as células endoteliais que se alinham aos vasos sanguíneos; são liberados na corrente sanguínea em um processo conhecido como desmarginação.

Além desses efeitos do cortisol, outra causa de leucocitose é a liberação de neutrófilos da medula óssea provocada pela presença de IL-1. A utilização de imunomoduladores na terapêutica clínica é um avanço na Medicina. Todas as substâncias que possuem efeito imunomodulador, algumas delas, como os corticóides, têm caráter preferencialmente supressor. Inibem a função das células acessórias e dos linfócitos T cooperadores, com diminuição da sua atividade secretora de citocinas. Também suprimem a resposta linfocitária ao estímulo das citocinas, a liberações dos grânulos das células citotóxicas e a produção de imunoglobulinas. Os corticosteróides produzem uma redução da proliferação de linfócitos, uma redução da produção de interleucina-2 (IL-2) e uma diminuição da expressão de receptores para IL-2.

A dexametasona e a prednisolona administradas *in vivo* modificam significativamente a capacidade dos linfócitos para responder a estímulos mitogênicos, assim como a produção de imunoglobulinas (MARTINEZ *et al.*, 2020). As células envolvidas nas respostas imunes possuem função reguladora, em que podem claramente promover ou suprimir as respostas imunológicas. Esse mecanismo regulador assegura que as respostas sejam apropriadas tanto qualitativamente quanto quantitativamente (VELOSO, 2019), mostrando que o próprio sistema imune se autorregula através da liberação de substâncias imunomoduladoras (VELOSO, 2019). Um imunomodulador pode ser definido como uma substância sintética ou biológica que tem a capacidade de modular, suprimir ou estimular os elementos do sistema imunológico incluindo os componentes da resposta imune inata e adaptativa. Os imunomoduladores são fisiologicamente usados quando o sistema imunológico se apresenta debilitado de modo que eles possam afetar e/ou corrigir, estimulando ou suprimindo, o sistema imune (SHAFI *et al.*, 2015).

Com a descoberta destes tornou-se possível a manipulação do sistema imune a favor de um estado saudável, na tentativa de reduzir os efeitos associados ou não à quimioterapia, à

rejeição de enxertos, à doenças alérgicas, à doenças cancerígenas etc (RHAMANI *et al*, 2020). Tradicionalmente, os imunomoduladores são agentes capazes de modificar a resposta imune, podendo o efeito ser estimulatório ou inibitório. Os agentes estimulantes ou adjuvantes imunes além de serem capazes de restaurar a resposta imune normal, estimulam o sistema estado imunológico dos indivíduos susceptíveis a invasões por agentes devido a fatores ambientais (RHAMANI *et al*, 2020).

A imunomodulação pode alterar o funcionamento do sistema imune de um indivíduo (MAKARE *et al.*, 2001, UJAH, G.A,2016). Os imunomoduladores são capazes de simultaneamente estimular algumas células do sistema imune e suprimir outras. Por exemplo, alguns compostos podem estimular a produção de anticorpos IgG2 e simultaneamente inibir a produção de IgM, ou ainda estimular linfócitos T e inibir linfócitos B. Estes podem aumentar os mecanismos de defesa do hospedeiro (imunostimulantes) ou diminuí-los (imunossupressores) (MASIHI, 2000; NUNES *et al*, 2003).

3.1.1 Atividade Imunomoduladora das Plantas Mediciniais

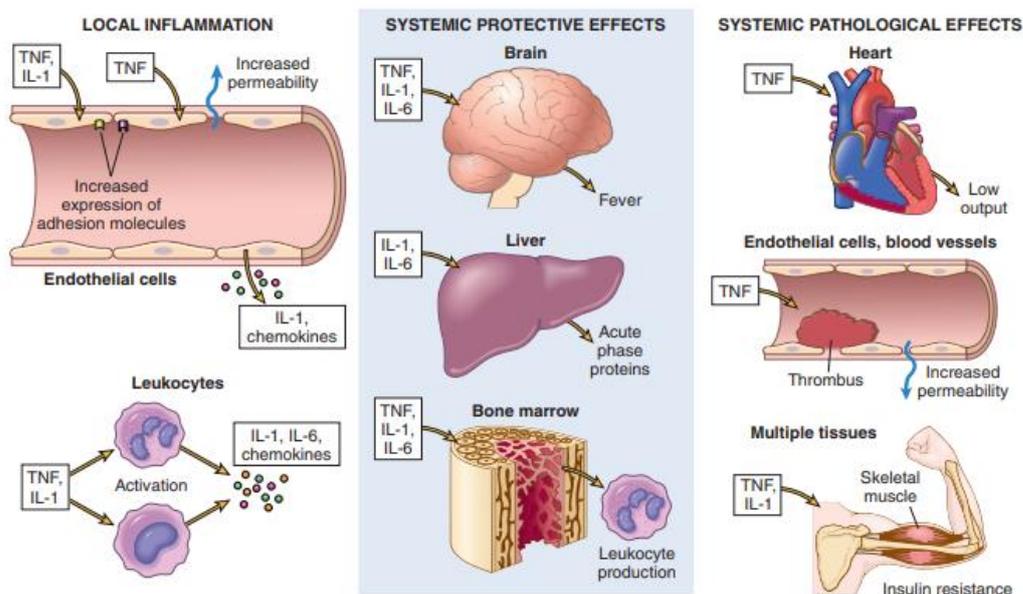
As plantas medicinais, são consideradas uma fonte promissora de compostos bioativos contra vários microrganismos infecciosos. Em acréscimo os produtos naturais derivados das plantas, geralmente são considerados seguros, acessíveis e mais eficazes do que os produtos farmacêuticos sintéticos (HAMEDT *et al.*, 2014; SOUZA,2017). Estudos têm constatado que as plantas são uma fonte valiosa de substância químicas úteis na modulação do sistema imune, com atividades imunostimuladoras, imunossupressoras e/ou imunorregulatórias, sendo esses compostos denominados de imunomoduladores (ANDRADE *et al*, 2021). O princípio fundamental da abordagem terapêutica imunomoduladora surgiu nos tempos antigos, através do emprego de plantas medicinais e seus produtos no tratamento de diversas doenças através da modulação do sistema imune (MARQUES, G.S *et al*, 2015). Além dos metabólitos secundários, os metabólitos primários também têm demonstrado diferentes funções no sistema imunológico, incluindo a ativação da imunidade celular e humoral (SEYFRIED *et al.*, 2016).

Uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, óleos e outras, oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune, apresentando atividade imunomoduladora (SOUZA, 2017). Os resultados encontrados nesses testes demonstram uma atividade imunomoduladora mediada tanto pelo aumento da resposta imune celular quanto humoral. Vale ressaltar a ligação entre as respostas imunes desencadeadas tanto pelas células NK quanto macrófagos, principalmente nos ensaios envolvendo tumores (LATHA

et al., 2000; PINHEIRO *et al.*, 2016). Nesse contexto, vários vegetais são alvo de investigações a respeito de suas atividades imunomoduladoras (MUKHERJEE *et al.*, 2014).

Um dos mecanismos da resposta imunológica envolve as citocinas, que representam um conjunto de várias moléculas, como interleucinas e quimiocinas que participam da emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento de uma resposta imune e compõem um dos elementos chave para perfeita regulação do sistema imunológico (NETEA *et al.*, 2015). Um exemplo de extrato que possui propriedade imunomoduladora relacionada às citocinas é o extrato etanólico da raiz de *Boerhaavia diffusa* que exibe essa atividade inibindo a produção de IL-2, TNF- α , IL-13, IL-15, interferon-gama (IFN- γ), IL-4, IL-5 e IL-10, moléculas importantes no controle da resposta inflamatória e das respostas mediadas por linfócitos T e B (CORDEIRO, M. F, 2017).

Figura 4- Resposta Inflamatória



Fonte: SCHENEIDER, A.

Segundo Manayi *et al.* (2015), a atividade imunoestimulante das plantas ou de suas preparações pode ocorrer por três mecanismos: ativação de fagocitose, estimulação dos fibroblastos, e aumento da atividade respiratória, que resulta no aumento da mobilidade de leucócitos.

O emprego de espécies vegetais no aumento da resistência imunológica encontra-se respaldado em uma pluralidade de estudos científicos com diferentes modelos experimentais,

sendo a propriedade imunoestimulante atribuída à presença de diferentes compostos, como flavonoides, taninos, polissacarídeos, saponinas e alcaloides, presentes em diferentes partes da planta; e a diversos mecanismos, particularmente associados ao sistema imune não específico (MARQUES, G.S *et al*, 2015).

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e ainda enzimas que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. O termo antioxidante significa “que impede a oxidação de outras substâncias químicas que ocorrem nas reações metabólicas ou por fatores exógenos, como as reações ionizantes.

Segundo a ANVISA (2009) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos. Do ponto de vista químico, Antioxidantes são compostos aromáticos que contêm no mínimo, uma hidroxila, podendo ser sintético como Butilhidroxianisol (BHA) e o Butilhidroxitolueno (BHT), amplamente utilizados pela indústria alimentícia, ou naturais, substâncias bioativas, tais como organosulfurados, fenólicos e terpênicos que fazem parte da constituição de diversos alimentos. Segundo a FDA (Food and Drug Administration), antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar alimentos através do retardamento da deterioração decorrentes da oxidação (DOSSIÊ ANTIOXIDANTE, 2009. ROCHEL, T.C, 2015).

3.2.1 Classificação dos Antioxidantes

Segundo a Food Ingredients Brasil, os antioxidantes podem ser classificados como:

- **Primários:** são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação de radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia.
- **Sinergistas:** são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada.
- **Removedores de Oxigênio:** são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autooxidação.

- **Antioxidantes Biológicos:** incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalase. Estas substâncias podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício.
- **Os agentes Quelantes:** sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhados na sua estrutura molecular promove a ação de complexação,
- **Antioxidantes mistos:** incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados do ácido cinâmico (ácido caféico).
- **Antioxidantes naturais:** Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia.

Há um crescente interesse de pesquisadores no desenvolvimento de substâncias antioxidantes, principalmente a partir de produtos naturais como plantas (G.L.S. OLIVEIRA, 2015).

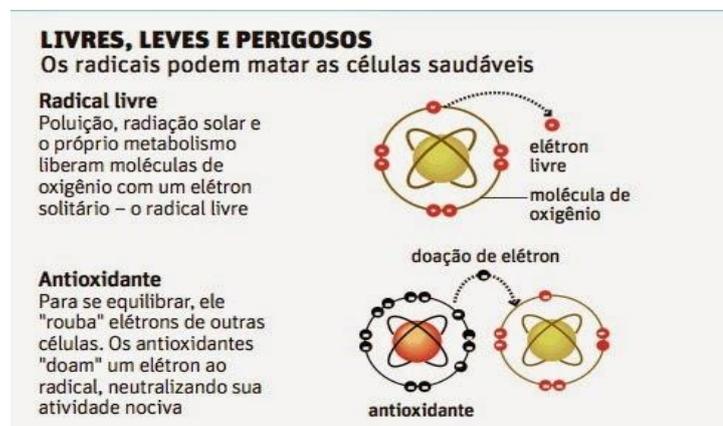
Os compostos bioativos presentes nas plantas podem agir como agentes antioxidantes. A ação destes compostos deve-se ao potencial de óxido-redução de determinadas moléculas, à capacidade destas moléculas competirem pelos locais ativos e receptores das diferentes estruturas celulares, ou por modularem a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos degenerativos de estruturas celulares (ADN, membranas). Segundo diversos estudos, muitas espécies de plantas medicinais exibem teores elevados de fenólicos totais, muitas vezes com valores de EAG > 20 mg/g. A atividade antioxidante está relacionada com o conteúdo fenólico e com o teor de flavonoides. As variáveis como a seleção do solvente extrator e a localização das plantas em estudo, que por sua vez, pode levar a uma alteração do perfil metabólico.

3.2.2 Mecanismos de Ação dos Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que inibem a oxidação, a qual consiste em uma reação química que pode produzir radicais livres (SALEHI *et al*, 2018), e agem por 3 mecanismos principais: neutralizando diretamente os radicais já formados; inibindo a formação de novos radicais e removendo ou reparando os danos causados pelos radicais (LI; JIA; TRUSH, 2016). Logo, os antioxidantes protegem os seres humanos contra doenças induzidas pelo estresse oxidativo (HISAM *et al*, 2018).

As plantas são uma importante fonte de antioxidantes naturais (YADANG *et al*, 2019). Produzem metabólitos secundários como polifenóis, alcaloides, terpenoides, óleos essenciais, entre outros (OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH, 2019); os quais são produtos naturais que regulam as interações entre as plantas e seu ambiente (JAMES; DUBERY, 2009). Seus polifenóis têm se destacado por possuírem potente atividade antioxidante e efeitos na prevenção de diversas doenças (DAI; MUMPER, 2010), além de serem um dos mais abundantes e diversificados grupos de metabólitos secundários, sendo que as suas propriedades antioxidantes fundamentam os efeitos antimicrobianos (OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH, 2019).

Figura 5- Imagem ilustrativa sobre a formação de radicais livres e a tentativa de equilíbrio pelos antioxidantes.



Fonte: <http://rspress.com.br/health4life>

3.2.3 Atividade Antioxidante em Plantas Medicinais

Os antioxidantes são úteis na redução e prevenção de danos causados pelos radicais livres devido à sua capacidade de doar elétrons, que neutralizam os radicais sem haver a formação de outros (ZHANG *et al.*, 2015).

Os vegetais são vulneráveis a danos que são causados pelo oxigênio ativo na reação e, desse modo, desenvolvem numerosos sistemas de defesa, resultando na formação de múltiplos antioxidantes potentes, ou seja, são compostos complexos encontrados em nossa dieta que atuam como um escudo protetor para nosso corpo contra quaisquer inimigos desastrosos, tais como doenças arteriais e cardíacas, artrite, catarata e também envelhecimento prematuro, em simultâneo com várias doenças crônicas. As plantas contêm determinados produtos químicos, como carotenóides, flavonóides, bioflavonóides, fenóis, fitoesteróis, os quais possuem propriedades antioxidantes. Como os radicais reativos ao oxigênio desempenham um papel importante na carcinogênese em outras doenças, os antioxidantes presentes nas plantas têm

recebido considerável atenção como agentes quimiopreventivos do câncer. (LEE *et al.*, 1998; SILVA, 2019) Entretanto, os antioxidantes sintéticos disponíveis no mercado apresentam efeito negativo à saúde, baixa solubilidade e atividade antioxidante moderada (BARLOW, 1990; SILVA, 2019). É relatado que cerca de 90% desses antioxidantes estão associados a toxicidades relacionadas a medicamentos e outros efeitos diversos que complicam o processo de tratamento. Portanto, novos esquemas de tratamento são necessários como alternativas para se evitar o uso. Nesta busca, as plantas medicinais representam uma opção viável, pois são relatadas como desprovidas de tais efeitos. (BEG *et al.*, 2011) Existem diferentes métodos para a determinação do potencial antioxidante dos vegetais, dentre eles podemos citar o método de redução da capacidade de energia, ensaio de eliminação de peróxido de hidrogênio e teste de atividade antioxidante dos óleos essenciais (método modificado do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas) e DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Para o DPPH, o resultado é expresso em IC50, sendo a concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical DPPH. Logo, a atividade antioxidante será maior quanto menor o valor de IC50 (CHOI *et al.*, 2002, SOUZA *et al.*, 2020).

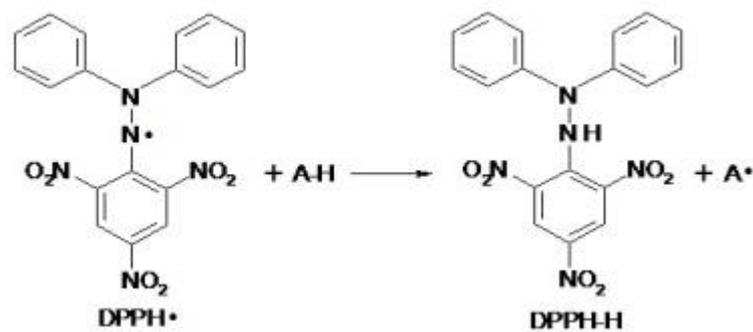
A atividade antioxidante em plantas medicinais é avaliada espectrofotometricamente pela medida da capacidade dos extratos particionados em reduzir o radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH (SOUZA *et al.*, 2017; SILVA, E.L.G.S, 2019). Para a quantificação da atividade antioxidante os extratos secos são dissolvidos em etanol a uma concentração de 10 µg/mL e uma alíquota de 100 µL é adicionada à 3 mL de solução de DPPH na concentração de 40 µg/mL. Após 30 de minutos de reação, sob abrigo de luz, procede-se a leitura das absorvâncias a 517 nm. Como controle positivo é utilizado uma solução de DPPH na concentração citada anteriormente. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) é determinada pela equação:

$$\%AA = ((\text{Abs. Controle} - \text{Abs. Amostra}) / \text{Abs. Controle}) \times 100$$

O qual: Abs. Controle = absorvância do controle (solução de DPPH sem antioxidante) e Abs. Amostra = absorvância da amostra (extrato) a ser testado (MELO *et al.*, 2006; SILVA, 2019). Para os extratos com atividade antioxidante positiva também é calculada a concentração eficiente (CE50), sendo está a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. A CE50 é calculada por meio de equações obtidas a partir da regressão quadrática da atividade antioxidante em função da concentração dos antioxidantes no meio de reação.

Foi demonstrado que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento de várias doenças como câncer, hepatite, anemia, malária, dentre outras. O aumento do status antioxidante total tem se mostrado importante na recuperação dessas doenças. O estudo de JAIN *et al.* 2010, teve como objetivo rastrear a atividade antioxidante e caracterizar o componente presente na planta responsável por ela (SILVA, 2019).

Figura 6- Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

3.3 CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade pode ser conceituada como a capacidade que uma substância possui de inibir a proliferação celular ou causar danos e lesões às células, que as levam a morte. Assim, as substâncias citotóxicas podem diminuir o poder de autorrenovação de um tecido, ou causar a sua degeneração por morte das células. Por sua vez, essa morte pode ocorrer por diversos tipos, que são agrupados em duas classes morfológicas, a necrose e a apoptose (CRUZ, VANESSA DE SOUZA, 2015).

A chamada citotoxicidade das substâncias solúveis num determinado meio extracelular é a capacidade das mesmas influenciarem nos mecanismos de quimiotaxia ou quimiorrepulsão nas células migratórias, através da ação de agentes tóxicos como substâncias químicas ou células imunes. Segundo SCHMALZ, em 1994, os testes de citotoxicidade são valiosos para a compreensão do comportamento biológico dos materiais avaliados, considerando-se as limitações destes testes durante a interpretação dos resultados, e que não irão substituir os testes *in vivo*, porém poderão diminuir substancialmente o número de testes, diminuindo o número de materiais com aplicabilidade potencialmente clínica (OLIVEIRA, M.P, 2009).

O teste de citotoxicidade detecta o potencial de um material produzir efeitos tóxicos *in vitro*, seja comprometendo a integridade das células ou interferir na sua taxa de crescimento.

Tal teste proporciona a seleção de materiais menos tóxicos, para estudos posteriores *in vivo* envolvendo animais e seres humanos. O parâmetro mais investigado pelos testes de citotoxicidade é a viabilidade celular, sendo determinada por diversos processos celulares (LIMA, O.C. *et al*, 2020). Dentre os diversos testes para a avaliação da citotoxicidade/função de substâncias: o teste do corante vermelho neutro, o teste de redução do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) - 2,5- difeniltetrazólio (MTT) ou o teste de liberação de enzimas citoplasmáticas como a lactato desidrogenase -LDH), o MTT se destaca como um dos mais empregados (LIMA, O.C. *et al*, 2020). A base deste teste é a comparação da citotoxicidade de um agente químico testado a doses não tóxicas de uma substância inócua às células como o meio de cultura (LIMA, O.C. *et al*, 2020).

A citotoxicidade é expressa na determinação da concentração dependente que reduz o crescimento celular utilizando-se um corante vital (MTT). A concentração de um agente químico testado reflete a inibição da viabilidade celular em 50% (IC50), calculada usando um modelo adequado de curva que expressa a resposta da curva de concentração (LIMA, O.C. *et al*, 2020).

3.4 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização experimental de espécies vegetais, com a finalidade de melhorar a alimentação, tratar e curar doenças que acometem a humanidade, constitui uma prática que remonta desde o início da civilização, criando assim, uma correlação entre o uso das plantas e a evolução do homem. Desde o momento em que o homem constatou a necessidade e a possibilidade de modificar o meio ambiente em prol de aumentar suas chances de sobrevivência, passou a utilizar as plantas como recursos terapêuticos (GADELHA, 2013).

O uso de plantas medicinais em forma de medicamento, assim como o conhecimento sobre as mesmas, tem acompanhado a humanidade ao longo dos anos (CARNEIRO *et al*, 2014), O conhecimento empírico sobre as plantas medicinais no decorrer da história da humanidade, se mostra eficaz no que se refere aos cuidados imediatos à saúde (FLOR *et al.*, 2015). A medicina praticada na Europa, conhecida hoje como medicina moderna, aos poucos foi sendo imposta pelo colonizador como a principal forma de tratamento médico a ser seguido justamente por ser passível comprovação científica. Assim, as demais formas de cuidado, autocuidado, tratamento e cura dos povos autóctones, por não serem comprovadas conforme a lógica cientificista da medicina positivista europeia, foram encaradas como primitivas,

ultrapassadas e, muitas vezes, desqualificadas pejorativamente como manifestações de credences populares e charlatanismo (CASTRO, 2019).

Desse modo, a busca por alternativas terapêuticas, como as plantas medicinais, torna-se muitas vezes o principal e único recurso natural disponível e acessível para algumas comunidades e grupos étnicos (BARBOSA *et al.*, 2010; WANDERLEY *et al.*, 2015).

O emprego de plantas medicinais para a manutenção e a recuperação da saúde tem ocorrido ao longo dos tempos, mas à medida que as pessoas idosas vão morrendo, uma gama de conhecimento sobre as plantas medicinais está sendo perdidas. O uso de plantas medicinais sempre esteve presente na sabedoria popular, articulando a cultura de gerações, passadas e atuais, e a saúde, uma vez que estes aspectos não ocorrem isoladamente, mas estão inseridos em um contexto histórico (MARTELLI *et al.*, 2019).

O uso de plantas medicinais é mencionado desde a pré-história, quando eram utilizadas na forma de cataplasmas, com o intuito de estagnar hemorragias e favorecer o reparo tecidual, sendo muitas dessas plantas ingeridas, para atuação em via sistêmica. Inúmeras plantas com poder medicinal são empregadas no tratamento de diferentes enfermidades, dentre elas, a cicatrização de feridas (MARTELLI *et al.*, 2019).

A planta medicinal segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é toda planta ou partes da mesma que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010). O uso dessas ervas é feito na maioria das vezes por adultos e idosos que buscam complementar o tratamento de uma doença crônica (RODRIGUES, 2000; CARNEIRO *et al.*, 2014). Seu efeito é determinado pela forma a qual a espécie é usada, desde sua posologia e preparo (LEMNIS, 2016). Assim, para se ter uma garantia no uso desses fitoterápicos e remédios derivados deles é necessário não apenas medidas de controle, mas a realização de campanhas que visem informar a população de seus riscos e benefícios, e os profissionais de saúde devem ter educação contínua sobre esses elementos. Estudos com esses vegetais alternativos tem merecido cada vez mais atenção, devido às informações que fornecem a ciência (CARNEIRO *et al.*, 2014).

3.4.1 Plantas Medicinais no Brasil

Quando os colonizadores europeus chegaram ao Brasil, ainda no século XV, encontraram os povos autóctones e estes apresentavam práticas de saúde próprias, entre elas o uso das plantas medicinais facilmente encontradas no seu entorno (CASTRO, 2019).

O Brasil tem a maior variedade genética vegetal do mundo com aproximadamente 46.000 espécies, sendo que cerca de 40% é exclusiva do território brasileiro. Esse número tende a crescer a cada ano, pois os botânicos identificam aproximadamente 250 novas espécies por ano (FIORAVANTI, 2019). Juntamente com esse grande aporte de matéria-prima o conhecimento acerca de como utilizar essas plantas também acompanha o povo brasileiro, pois são conhecimentos que geralmente são reportados de geração a geração, entretanto, sem os parâmetros científicos que norteiam a eficácia do tratamento (DE PAULA e DA CRUZ- - SILVA, 2010; VARGAS *et al.* 2019).

Neste contexto temos a família Capparidaceae cujas espécies têm amplas propriedades terapêuticas. Dentre as espécies da família Capparidaceae, temos a *Crataeva adansonii* que é um dos antidiabéticos pertencente à família Capparidaceae e comumente chamada pêra, alho sagrado ou planta do templo. Na farmacopeia tradicional, a planta é usada como adstringente e trata afecções como urinária, túbulos renais, uterina, gastrointestinal, pele, inflamatório, asma e picadas de cobra.

Podemos citar também a *Crataeva nurvala* é uma planta medicinal importante, cuja casca é amplamente utilizada na Ayurveda como remédio para pedras nos rins, infecções do trato urinário, doenças relacionadas à próstata e hipertrofia benigna da próstata. A *Crataeva religiosa* Forst usada na medicina tradicional para diferentes doenças, como laxante, estimulante do apetite. Os antioxidantes derivados dessa planta são muito eficazes na prevenção de efeitos destrutivos, processos causados pelo estresse oxidativo. Estudo comprovaram que o extrato etanólico da casca de *C. magna* Lour apresentou significativa atividade antiurolitiática.

Crataeva tapia é uma espécie arbórea encontrada no semiárido brasileiro, na vegetação da Caatinga em áreas de rochas cristalinas, em áreas sedimentares e em matas ciliares. Pertence à Ordem Brassicales, Família Capparaceae (LORENZI, 2008; APG III, 2009; MORO, 2014). É uma frutífera nativa, de copa arredondada e densa, cujos frutos comestíveis são ingeridos como refresco e bebida vinosa, além disso, possui características medicinais, ecológicas e econômicas pelo uso de sua madeira (SOUZA, C.V, 2018).

É cientificamente denominado como *Crataeva tapia* L. (TROPICOS, 2017), mas também é citado como *Crataeva tapia* L. na literatura (CNIP, 2019). Em Cronquist (1981), um sistema natural de classificação, o Traipá pertence à Subclasse Dilleniidae e Ordem Capparales. Mas na classificação mais recente (APG III, 2017), com base nas características filogenéticas, esta

espécie está agrupada na Classe Equisetopsida, Subclasse Magnoliidae Nová ex Takht, Superordem Rosanae Takht, Ordem Brassicales Bromhead, Família Capparaceae Juss e Gênero *Crateva* L. Nativo do Brasil. No entanto, não é endêmica do Brasil, Segundo FORZZA (2010) está presente no Norte (estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), Nordeste (estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso); Sudeste (estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo); e regiões do Sul (estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) e também em Abrolhos, Fernando de Noronha e Trindade (ilhas oceânicas). Quanto aos domínios fitogeográficos, a espécie está presente na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (FORZZA, 2010).

A casca tem um odor desagradável; é conhecido por ter tônico, propriedades estomacais, antidiarreicas e febrífugas. As raízes são muito ácidas e seu suco aplicado na pele produz bolhas. As folhas às vezes são usadas como cataplasmas (STANDLEY, 1961: 305). É adstringente, sendo usada contra a malária e outras doenças em Martinique (A. WOOD s.n., NY), os índios jaguá fazem uma tintura roxa das frutas (E. LITTLE & R. LITTLE 9579, NY), a casca é raspada e utilizada no tratamento e cura de dor de cabeça dos índios Paumaris (D. CAMPBELL P21233, NY). É usada como cataplasma para aliviar o reumatismo. As frutas são usadas para pesca (C. PETERS 18, NY)

3.4.2 Descrição botânica da *Crataeva tapia*

3.4.2.1 Tronco e casca

De acordo com Lorenzi (2008), a árvore de *Tapia* atinge 5 a 12 m (16,4 a 39,4 pés) de altura. Coroa redonda e densa, com tronco cilíndrico geralmente tortuoso e 20-40 cm (7,87 a 15,7 in) de diâmetro. Sua casca é acastanhada e áspera (LIMA, 2012).

3.4.2.2 Folhas

Folhas trifoliadas (única planta Capparaceae registrada no Brasil com esta característica) (NETO e JARDIM, 2015). Possui pecíolo de 6 a 12 cm de comprimento (2,36 a 4,72 pol.) (LORENZI, 2008). Folhas alternadas em espiral sem estípula, ovaladas de lâmina foliar elíptica, com topo acuminado ou cuspidado, base obtusa, margem inteira (NETO e JARDIM, 2015).

3.4.2.3 Flor / inflorescência

Racemo axilar ou terminal. Sépalas de 3 a 5 mm, lanceoladas, glabras, com nectários basais. Pétalas brancas unguiculadas (NETO e JARDIM, 2015). Flores hermafroditas, ou poucas flores masculinas no topo do racemo.

3.4.2.4 Frutas, sementes e síndrome de dispersão

O fruto é uma baga, globosa ou subglobosa, amarela, com pedúnculo de 4 a 5 cm (1,6 a 2 pol.) de comprimento. Semente solitária, marrom-escura, curvada (de forma que o topo toca a base quase formando um círculo) (LIMA, 2012). Segundo Lorenzi (2008), as árvores de *C. tapia* florescem no período seco (agosto a novembro) e seus frutos amadurecem na transição da estação seca para a chuvosa (janeiro a maio). Mas NETO *et al.* (2014) afirmam que as espécies apresentam flores e frutos nos meses de janeiro, julho e setembro a dezembro.

Figura 7- Detalhe dos galhos com folhas e frutos da planta Tapiá.



Fonte: APNE/CNIP.

Figura 8: Fruto da *Crataeva tapia*.



Fonte: Florestaguadonorte.com.br

3.4.3 Propriedades Terapêuticas da *Crataeva tapia*

A casca da planta possui várias propriedades medicinais, por isso tem sido explorada devido à presença de um importante metabólito secundário, o lupeol, de forma que a planta é amplamente utilizada no sistema medicinal tradicional da Índia (SHARMA *et al.*, 2013). Estudos comprovam que uma proteína isolada a partir da casca da *Crataeva tapia* apresentou propriedades biológicas como anti-inflamatório, analgésico, antitumoral e atividades inseticidas (ZHANG *et al.*, 2013), sendo também utilizada como tônico, estomáquico, antidisentérico, febrífugo e no combate das infecções do trato respiratório, devido a propriedades medicinais existentes em suas folhas, cascas e frutos (SHARMA *et al.*, 2013). Também foi verificada que as folhas de *C. tapia* apresentam grande potencial antioxidante que inibe a ação de radicais livres. As atividades de antioxidantes da planta têm sido atribuídas a vários mecanismos, tais como a prevenção do início da cadeia, a ligação com catalisadores de íons de metais de transição, a decomposição de peróxidos, a prevenção da continuidade da captação de hidrogênio, a capacidade de redução e a capacidade de eliminação de radicais (LIU *et al.* 2013).

O extrato das folhas da *C. tapia* também apresentou forte atividade alelopática evidenciando potencial para exploração futura como fonte de herbicida natural, possuindo a mesma potencial para o desenvolvimento de compostos antibacterianos contra bactérias *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* (SHARMA *et al.*, 2013).

As partes da *Crataeva tapia* como as folhas e as cascas, possuem várias propriedades que incluem anti-inflamatório, antioxidante, anti-ártrico, anti-fertilidade, antimicótico, antidiabético, antimicrobiano, antidiarreico, cicatrização de feridas, anti-helmíntico, propriedade urolítica, propriedade nefrolítica, atividade hepatoprotetora e cardioprotetora, evidenciando-se sua significativa importância medicinal.

3.4.3.1 Parede Celular Vegetal

A parede celular vegetal compreende uma estrutura complexa e dinâmica que executa uma série de funções essenciais. Essa estrutura estabelece o tamanho e a forma final da célula, exerce a comunicação intercelular e ainda desempenha importante papel na interação de plantas com microrganismos – agindo na defesa contra possíveis patógenos e variações adversas ambientais (CAFFALL & MOHNEN, 2009). Além disso, sua estrutura é continuamente

modificada para acomodar os estádios de desenvolvimento da célula e as condições ambientais (CAFFALL & MOHNEN, 2009).

Os polissacarídeos e glicoconjugados presentes na parede celular vegetal têm sido bem caracterizados estruturalmente. A parede celular vegetal consiste em uma porção microfibrilar, formada por celulose, que é seu principal componente (KEEGSTRA, 2010). Além da celulose, a parede celular vegetal contém vários polissacarídeos, localizados na matriz extracelular, os quais são, em geral, agrupados em duas principais categorias: (1) hemiceluloses e (2) pectinas (KEEGSTRA, 2010).

A parede celular vegetal também contém muitas proteínas e glicoconjugados, incluindo várias enzimas e proteínas estruturais. Como exemplo, podem ser citadas as arabinogalactana-proteínas, moléculas estruturalmente complexas, encontradas na membrana plasmática e na parede celular vegetal, as quais apresentam importantes funções em processos de reconhecimento e sinalização celular (ELLIS *et al.* 2010).

3.4.3.2 Celulose e hemiceluloses

A celulose consiste em cadeias de monômeros de glucose (Glc) na configuração D, com ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4), que formam polímeros lineares e insolúveis em água (KEEGSTRA, 2010). As cadeias lineares interagem entre si, através de ligações de hidrogênio, formando microfibrilas longas e cristalinas (KEEGSTRA, 2010). Essa estrutura é resistente a grandes trações e representa cerca de 20% a 30% da matéria seca da parede celular primária, podendo ocupar até 15% dessa região em volume, enquanto que, em paredes celulares secundárias, pode atingir de 40 a 90% do peso da biomassa dessa estrutura (PÉREZ & MAZEAU, 2005). As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polímeros que apresentam uma cadeia principal composta por unidades de glucose (D-Glc), manose (D-Man) ou xilose (D-Xyl) β -(1 \rightarrow 4), ligadas em configuração equatorial no C1 e C4 (OCHOA-VILARREAL *et al.* 2012).

A classificação das hemiceluloses é feita de acordo com o monossacarídeo majoritário presente na cadeia principal. Dessa forma, os principais tipos de polissacarídeos encontrados nesse grupo incluem as xilanas, as arabinoxilanas, as galactomananas, as glucomananas, as xiloglucanas, as mananas e as β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) glucanas (SCHELLER & ULVSKOV, 2010). As hemiceluloses estão presentes no meio extracelular, conectadas, através de interações moleculares, com as microfibrilas de celulose, formando a matriz da parede celular. Entretanto, esses polímeros, ainda podem atuar como moléculas sinalizadoras ou como precursores delas,

sendo possível, também, agir na forma de substâncias de reserva (SCHELLER & ULVSKOV, 2010).

3.5 HISTÓRICO DAS PECTINAS

Os vegetais produzem uma grande variedade de biomoléculas e compostos químicos, que exibem um amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas essas plantas temos a *Crataeva tapia* se enquadra nesse aspecto de fonte natural de produtos com propriedades biologicamente ativas, uma vez que, pode ser extraído da mesma as lectinas, pectinas e ligninas, por exemplo.

Atualmente, com sua melhor caracterização e definição, sabe-se que tais moléculas são responsáveis por decifrar glicocódigos, por meio de interações de superfície complexa e desempenham um papel central em um número considerável de funções e atividades biológicas (CINTRA, A.J.L, 2017).

A pectina é um polissacarídeo encontrado nas cascas de frutas responsável por auxiliar o fruto no seu crescimento celular e conferir rigidez no seu tecido. Possuem função adesiva entre as células, enrijecimento, textura e contra choque mecânico nos frutos, pode atuar como agente estabilizante, gelificante, espessante e fibra solúvel. Devido a essas características, a pectina é bastante utilizada na indústria de alimentos e farmacêutica (SANTOS, 2015).

As pectinas são um grupo de polissacarídeos estruturalmente heterogêneos amplamente distribuídos nas paredes celulares primárias e na lamela média da parede celular dos vegetais (LUO *et al.*, 2017). As pectinas contribuem para a adesão entre as células e para a resistência mecânica da parede celular, sua quantidade e natureza são determinantes para a textura de frutos e vegetais em geral, durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento (OLIVEIRA, JAINE, 2019). As paredes celulares e a lamela média das frutas são constituídas por várias moléculas poliméricas classificadas tais como proteínas, celulose, hemicelulose e polissacarídeos pécticos. Porém, o conteúdo e a estrutura química dessas moléculas sofrem modificações a depender do estágio de maturação e do tipo de fruta (YAMAMOTO, 2011). Os compostos pécticos são constituídos de resíduos de ácido D-galacturônico, o qual é um derivado da glicose. Polímeros deste derivado de açúcar são conhecidos como ácido péctico. Os compostos pécticos se encontram por toda a lamela média, onde funcionam como agente de união entre as paredes celulares adjacentes. Existem três formas primárias da pectina: protopectinas, ácidos pectíneos e ácidos pécticos (ALKORTA, 1998; SUHAIMI, 2016).

- **Protopectinas:** Estão presentes nos tecidos dos frutos imaturos. Nesta condição as protopectinas se encontram ligadas ao cálcio das paredes celulares formando o pectato de cálcio, o qual é insolúvel em água, e tem a maior parte dos seus grupos carboxílicos esterificados (ALKORTA, 1998; SUHAIMI, 2016).
- **Ácidos pectínicos:** São obtidos a partir da hidrólise da protopectina pela ação das enzimas poligalacturonases. São consideradas substâncias coloidais, não necessariamente solúveis em água e que contém uma proporção variável de grupos metoxilas na forma de ésteres (ALKORTA, 1998).
- **Ácidos pécticos:** São oriundos da ação das enzimas pectinametilsterase durante o processo de amadurecimento, promovendo a remoção dos grupos metílicos dos polímeros, dando origem às substâncias pécticas que não formam gel (ALKORTA, 1998).

As primeiras citações sobre pectina datam de um artigo inglês de 1750 sobre preparação de geleia de maçãs. A descoberta da pectina, enquanto composto químico, foi feita por VAUQUELIN em 1790 e BRACONNOT, no ano de 1824, foi o primeiro a caracterizá-la como composto das frutas responsável pela formação do gel e sugerir o nome pectina, proveniente do grego *πηχτοζ*, que significa espesso. A ocorrência de substâncias pécticas diferindo em solubilidade e facilidade de extração é conhecida desde 1848, quando FREMY reportou a existência de um precursor péctico insolúvel em água, denominado posteriormente de protopectin. Apesar disso, sua estrutura não é tão bem conhecida ainda que existam modelos para ilustrá-la. Os dezessete monossacarídeos que constituem as pectinas são agrupados em diferentes tipos de cadeias formados por ácidos urônicos, hexoses, pentoses e metilpentoses, além disso, o metanol, o ácido acético e os ácidos fenólicos podem estar presentes como substituintes nessas unidades estruturais. Elas ainda podem existir nas formas furanosídicas e piranosídicas com ligações diversas entre os monômeros como $\alpha(1,4)$, $\alpha(1,5)$, $\beta(1,3)$, $\beta(1,4)$ e $\beta(1,6)$ (CANTERI *et al.*, 2012)

Nessa época, já se discutia a dificuldade em estabelecer estudos comparativos quanto à composição, ao tipo e à distribuição dos compostos pécticos em vegetais, devido aos diferentes métodos de extração e análises empregados (CANTERI, M.H.G, 2012).

CIRIMINNA *et al.* (2015) relata que tem se investigado amplamente a extração de pectinas de outras fontes vegetais além da maçã e das cascas de cítricos como grãos de café,

cactos do gênero *Opuntia*, sementes de girassol e beterraba, mas a maçã (14,0%) e as cascas de cítricos (85,5%) ainda são a principal fonte de obtenção do polissacarídeo.

Por ser encontrada como constituinte natural dos alimentos vegetais, a pectina tem seu uso permitido em todo o mundo. É amplamente usada como agente gelificante, espessante, 32 emulsificantes, texturizador e estabilizante, porém devido a sua biocompatibilidade e não toxicidade, têm-se estudado sua aplicabilidade em biotecnologia e na indústria farmacêutica com destaque para liberação controlada de fármacos (CIRIMINNA, *et al.* 2015; WANG *et al.* 2018).

3.6 HISTÓRICO DA PRODUÇÃO COMERCIAL DA PECTINA

A obtenção de um extrato líquido de pectina foi registrada em 1908 na Alemanha e o processo propagou-se rapidamente pelos Estados Unidos. A produção de pectina desenvolveu-se aos poucos, no início do século XX, na Europa e nos Estados Unidos, usando principalmente o bagaço de maçã. Em 1940, cerca de 60% da pectina produzida no mundo era de bagaço cítrico, devido à abundância de matéria-prima gerada pela industrialização de sucos.

Quanto à produção comercial, HERMANN HERBSTHREITH descobriu, na década de 1930, o potencial de uso e aplicação do bagaço de maçã, subproduto até então descartado da produção 21 do suco. Em 1940, cerca de 60% da pectina produzida no mundo era de bagaço cítrico, devido à abundância de matéria-prima gerada pela industrialização de sucos (CANTERI *et al.*, 2012).

Recentemente, foram desenvolvidos estudos sobre potencial de uso do bagaço de maçã na recuperação de compostos fenólicos nativos, associados ao escurecimento, para utilização como agentes antioxidantes, resultando na coloração mais clara da pectina obtida. Na maioria dos países em vias de desenvolvimento, a pectina é importada. A produção regionalizada por pequenos processadores poderia suprir a demanda com custo mais baixo, desde que existisse incentivo governamental. Entretanto, existem algumas barreiras a serem superadas, como o custo, a dificuldade para isolamento da pectina sob a forma de pó em pequena escala e a obtenção de uma gama de pectinas com propriedades específicas, e não apenas de um tipo de produto.

3.7 HISTÓRICO DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DA PECTINA

Embora a extração de pectina varie de acordo com a matéria-prima, em linhas gerais, o processo compreende: extração do vegetal de origem em meio aquoso ácido; purificação desse líquido extraído e isolamento da pectina por precipitação (OLIVEIRA, F.S, 2012).

A extração em meio ácido sob aquecimento é o método utilizado industrialmente para obtenção de pectinas a partir de resíduos industriais de sucos de frutas, onde, diferentes ácidos podem ser utilizados nesse processo. Em alguns países, os ácidos minerais são proibidos, sendo substituídos por cítrico, láctico ou tartárico (APUD CANTERI *et al.*, 2012, p. 2).

A produção industrial brasileira teve início no ano de 1954, na cidade de Limeira-São Paulo, sendo a única fábrica de pectina ainda hoje no País e maior produtora mundial de pectina cítrica (OLIVEIRA, F.S,2012).

3.8 PECTINAS: NOMENCLATURA, FUNÇÃO E OCORRÊNCIA

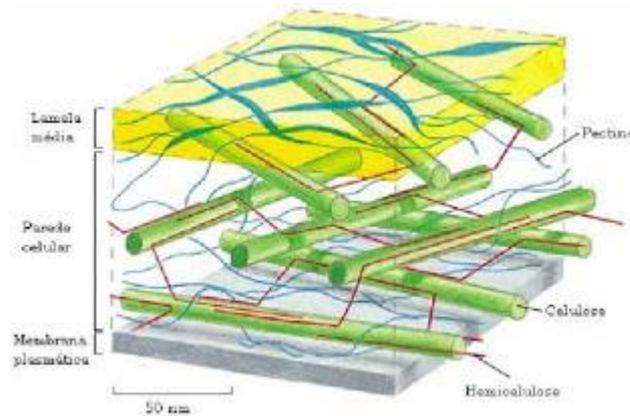
Segundo PAIVA *et al.*, OLIVEIRA, F.S, 2012 a fim de padronizar a nomenclatura e facilitar o entendimento das substâncias pécticas, em 1944 o comitê da American Chemical Society revisou e definiu estas substâncias complexas como:

- **Substâncias pécticas:** todos os materiais que contêm ácidos poligalacturônico em sua composição;
- **Protopectinas:** Consistem na forma natural da pectina, quando associada à celulose, hemicelulose e lignina.
- **Ácidos pécticos:** são cadeias de ácidos galacturônicos totalmente livres de metoxilas e pouco solúveis em água. São oriundos da ação das enzimas pectinametilesterase durante o processo de amadurecimento do fruto;
- **Pectina:** são ácidos pectínicos solúveis em água, com os grupos carboxilas do ácido galacturônico variavelmente esterificados com metanol.

As substâncias pécticas ocorrem sem exceção na parede celular primária e na lamela média das células vegetais (Figura 9). A seiva da planta usualmente contém apenas traços das substâncias pécticas dissolvidas. Há relatos também da presença de pectinas no citosol da célula vegetal. As pectinas encontram-se naturalmente em associação com a celulose e hemicelulose, que auxiliam na adesão entre as células, sendo considerada a pectina, o 23 principal agente

cimentante da parede celular, contribuindo desta forma para firmeza, resistência mecânica e coesividade do tecido (OLIVEIRA, 2012).

Figura 9- Estrutura da Parede Celular



Fonte: SANTOS, 2007.

3.9 PRINCIPAIS FONTES DE PECTINA

Apesar da pectina ser encontrada na maioria dos tecidos das plantas, o número de fontes que podem ser utilizadas para produção da pectina comercial é muito limitado, isto porque a capacidade de produzir gel das pectinas depende do grau de esterificação e do tamanho da molécula. Logo, a detecção de uma grande quantidade de pectina em um fruto, por si só, não é suficiente para qualificar que a fruta atua como uma fonte de pectina comercial, devido à variação destes parâmetros (VASCONCELOS, J.C.B, 2019).

A quantidade de pectina contida em cada matéria-prima modifica, de acordo com a botânica do produto vegetal. Nas indústrias os mais utilizados como subproduto são: bagaço de maçã albedo cítrico, polpa de beterraba e girassol, visto que, possui um teor de pectina superior 26 a 15% em matéria seca a 15% em matéria seca. Na tabela 1 podemos observar valores de pectina para alguns frutos em destaque. A extração de pectina nessas indústrias ocorre com adição de meio ácido em alta temperatura. Segundo CANTERI *et al.*, (2011) menciona que, por haver uma grande variedade de matéria-prima utilizada na extração há a influência do subproduto no poder de formação de gel da pectina (VASCONCELOS, J.C.B, 2019).

Tabela 1- Teor de Pectina em Matéria Seca de Principais Frutas Utilizadas na Extração

FRUTO	TEOR DE PECTINA (% MS)
Maçã	4-7
Bagaço da maçã	15-20
Albedo cítrico	30-35
Bagaço da beterraba	15-20
Cenoura	10
Tomate	3

Fonte: (BECKMAM, 2019)

3.10 EXTRAÇÃO DE PECTINA

O processo de extração é composto por duas etapas principais, a hidrólise de protopectina em pectina usando ácidos, seguido de precipitação por etanol. A principal desvantagem dos métodos convencionais está na combinação entre tempo e temperatura de extração para a obtenção de um bom rendimento de extrato. A longa exposição da pectina submetida a altas temperaturas pode ocasionar a degradação do produto. Devido a isso, novos métodos como extração assistida por micro-ondas, extração enzimática e extração assistida por banho ultrassônico tornaram-se mais populares (SANDARANI, 2017).

A extração assistida por micro-ondas envolve aquecimento dielétrico das moléculas através da exposição à radiação de micro-ondas. O solvente absorve a radiação da energia incidente e inicia-se rotação dipolar, levando à geração de calor dentro dos tecidos da planta. É uma técnica que tem sido investigada por muitos pesquisadores e descobriu-se que seu uso pode acarretar um aumento considerável no rendimento do extrato, sem perda significativa nas características do produto final comparado com a extração convencional (SANDARANI, 2017; ADETUNJI, ADEKUNLE, *et al.*, 2017).

A extração enzimática da pectina é ambientalmente segura e mais eficaz em termos de rendimento de pectina. Enzimas diferentes, como poligalacturonase, protease, α -amilase, xilase, b-glicosidase, endopoligalacturonase, pectinesterase e outras, são usadas na extração de pectina, pois têm a capacidade degradar a pectina e modificar as propriedades físicoquímicas da pectina (SANDARANI, 2017).

O banho ultrassônico para extração de compostos tem sido relatado como um dos mais rápidos, mais eficientes e menor gasto de solvente. As ondas ultrassônicas geram um efeito de cavitação no solvente, resultando em movimento mais rápido das moléculas e maior penetração do solvente no material. Isso resulta em uma liberação acelerada dos compostos (CHEMAT *et al.*, 2017).

De acordo com SANDARANI (2017), o ácido clorídrico foi o melhor solvente extrator para pectina por diversos autores, o que conferia ao processo maior rendimento. Já o ácido cítrico, não apresentava resultados tão bons, entretanto, causa uma menor degradação da estrutura da pectina, gerando um produto com melhores propriedades gelificantes e é um solvente que se adequa aos princípios de química verde, por ser biodegradável e ecologicamente seguro (SANTOS, E.E, 2020).

As pectinas extraídas apresentam características diferentes (grau de esterificação, tamanho das partículas, conteúdo de açúcares, teor de cinzas e outros) e têm conseqüentemente propriedades funcionais diferentes, o que possibilita o estudo de fontes alternativas de extração (MIRANDA, B.M, 2019). A extração da pectina pode ser realizada por meio aquoso ácido, básico, ou com agentes quelantes ou por ação de enzimas. Normalmente, o processo de obtenção da pectina mais utilizado abrange: 1) extração aquosa do material da planta; 2) purificação do extrato líquido e 3) separação do extrato da pectina do líquido. A escolha do método de extração influencia diretamente no rendimento e nas propriedades da pectina. (MIRANDA, B.M, 2019).

A produção industrial de pectina envolve várias etapas, tais como; a preparação da matéria prima, a separação dos compostos presentes na matéria-prima, a conservação da protopectina, a separação de resíduos insolúveis, a precipitação, a purificação e a secagem da pectina extraída; bem como a embalagem, o armazenamento e a comercialização (CANTERI *et al*, 2012).

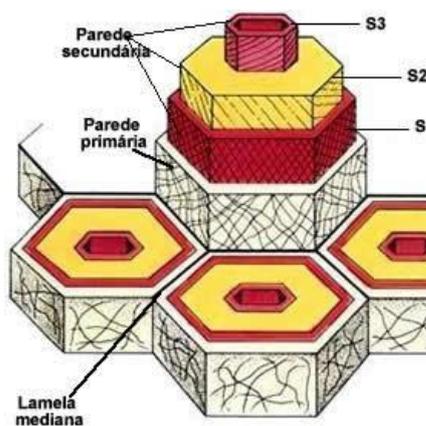
As pectinas de uso comercial podem ser obtidas na forma líquida ou sólida. O método usual para a obtenção de pectina consiste na extração com solução aquosa ácida (pH 3 a 4); no entanto, diversos outros procedimentos têm sido propostos, como o uso de solventes orgânicos inertes, neutros e miscíveis em água, em temperaturas moderadas; tratamento prévio com solução de íons cálcio e posterior extração com solução de ácido oxálico; extração com uso de meio alcalino e um agente sequestrante, seguida de aquecimento; ou ainda, por meio do uso de microrganismos que liberam enzimas capazes de extrair a pectina sem degradá-la(CANTERI *et al*, 2012).

3.11 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA PECTINA

3.11.1 Localização

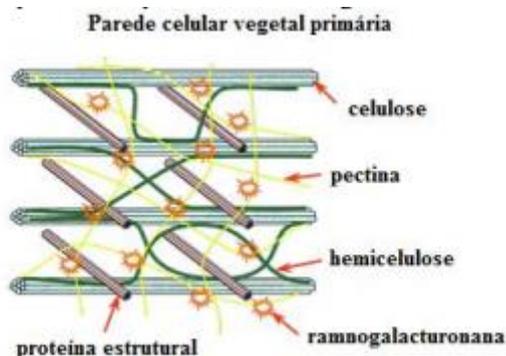
A pectina está localizada na parede celular de vegetais superiores associada a outros componentes. Essa parede pode ser dividida em duas camadas denominadas de primária e secundária (fig. 10). Dois modelos estruturais são propostos para a parede celular primária, cuja área de superfície aumenta durante a expansão da célula: tipo I, composto principalmente por celulose, xiloglucanas, extensina e pectina (20-35%) e tipo II, compreendendo essencialmente celulose, glucoarabinoxilanas e compostos fenólicos e menor proporção de pectina (10%). A parede secundária, estrutura complexa adaptada à função da célula, é formada internamente à parede primária na diferenciação (CANTERI *et al*, 2012).

Figura 10- Três camadas de parede secundária



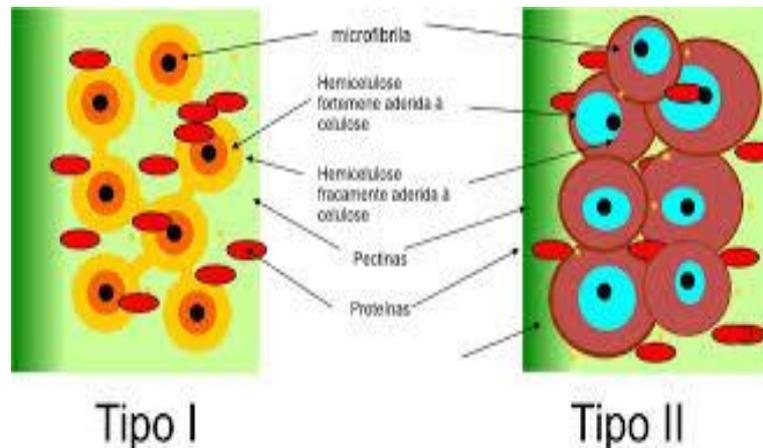
Fonte: CASTRO, N. M.

Figura 11- Localização da pectina na parede celular vegetal



Fonte: http://plantphys.info/plant_physiology/basiccytology1.shtml

Figura 12: Arquitetura das Paredes Celulares Tipo I e II



Fonte: Adaptado de BUCKERIDGE *et al*, 2008.

Os fatores que envolvem a deposição de pectina durante a formação da parede celular ainda não estão elucidados. Os polissacarídeos pécticos parecem ser importantes no controle da porosidade da parede, na adesão de células subjacentes e no controle do ambiente iônico da parede celular (CANTERI *et al*, 2012; GUIMARÃES, I.C.S.B, 2019).

Outra função está ligada aos mecanismos de defesa vegetal. O ácido galacturônico, unidade básica da pectina, é um componente essencial de elicitores ativos da parede celular, substâncias que provocam o acúmulo de fitoalexinas com propriedades antibióticas nos locais de infecção vegetal, (CANTERI *et al*, 2012).

3.11.2 Geleificação da pectina

O estado “gel” é considerado como sendo um estado próximo ao sólido, pode ser definido também como uma rede tridimensional sólida que retém entre sua malha uma fase líquida. Nesta rede a pectina é considerada um colóide hidrófilo com carga negativa, que é estabilizada por uma camada de água envolvendo cada micélio. (OLIVEIRA, F. S, 2012).

A formação da geléia ocorre no momento em que a pectina precipita, ramificando os aglomerados de micélio na presença do açúcar, que atua como um agente desidratante, e na presença de íons de hidrogênio, que agem para reduzir a carga negativa sobre a pectina, onde a mesma ficará num estado intermediário, entre a solução e o precipitado. A adição de qualquer

material que reduza a solubilidade da pectina dissolvida vai favorecer a formação do gel. (OLIVEIRA, F. S, 2012).

3.11.3 Estrutura Molecular da Pectina

Em 1934, as pectinas cítricas foram reconhecidas como cadeias lineares de ácido galacturônico e desde então, evidenciou-se que a pectina é uma molécula altamente complexa e o recente grande desafio é acomodar toda informação disponível em um único modelo estrutural (CANTERI MHG, 2012).

As pectinas existem como regiões "lisas" (smooth) ou "ciliares" (hairy). Regiões lisas são constituídas por cadeias lineares de resíduos de ácido α -D-(1 \rightarrow 4) -galacturônico. Outros açúcares estão presentes ou ausentes apenas em pequenas quantidades. Os grupos carboxílicos dos resíduos de ácido galacturônico podem ser metil esterificado. As regiões peludas podem conter ramnogalacturona I (RGI) e ramnogalacturona II (RGII). RGI é o segundo maior tipo de polissacarídeo. A espinha dorsal do RGI consiste essencialmente de celulose cristalina em sequência alternada de (1 \rightarrow 4) ligada a unidades de ácido α -D-galacturônico e a resíduos de α -(1 \rightarrow 2) -L-raminose. A espinha dorsal RGII é composta de pelo menos sete unidades de ácido α -D- 21 galacturônico (1 \rightarrow 4) e raramente apresenta-se ligada a resíduos de ramnose e resíduos característicos de açúcares. Esta, que consiste apenas de ácido galacturônico e não contém quaisquer resíduos da ramnose, o seu nome não reflete a sua estrutura. Portanto, é mais bem descrito como homogalaturônica ramificada (ONOFRE, VARGAS JÚNIOR, 2016).

3.11.4 Características estruturais de pectinas e de polissacarídeos contendo arabinose e/ou galactose

3.11.4.1 Homogalacturonanas (HG)

São compostas por um homopolímero linear de unidades de D-GalpA α -(1 \rightarrow 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 (CAFFALL & MOHNEN, 2009; SCHELLER & ULVSKOV, 2010). 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 (CAFFALL & MOHNEN, 2009).

3.11.4.2 Ramnogalacturonanas tipo I

As ramnogalacturonanas tipo I (RGI) consistem em cerca de 20% a 35% das pectinas. Essas moléculas são caracterizadas por apresentarem uma cadeia principal contendo unidades repetitivas de GalpA e Rhap: $[\rightarrow 4) -\alpha\text{-DGalpA-(1}\rightarrow 2) -\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow]_n$, (ATMODJO *et al.* 2013).

3.11.4.3 Ramnogalacturonanas tipo II

As ramnogalacturonanas tipo II (RG-II) constituem cerca de 10% das pectinas. Apesar de ser o polissacarídeo péctico mais complexo, apresenta uma estrutura mais conservada. A característica mais marcante dessa molécula é possuir açúcares raros. Nesse grupo, encontram-se: 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose, Apif, ácido acérico (3-carboxi5-deoxi-L-xilose), Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico) e Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heotulosárico), incluindo-se, também, mais de 20 ligações glicosídicas, que geram funções críticas no crescimento e desenvolvimento das plantas (ATMODJO *et al.* 2013). A estrutura primária das RG-II, consiste em D-GalpA $\alpha\text{-(1}\rightarrow 4)$ ligados, formando uma cadeia principal homogênea e linear (ATMODJO *et al.* 2013).

3.11.4.4 Apiogalacturonanas e xilogalacturonanas

As apiogalacturonanas são caracterizadas pela presença de unidades de $\beta\text{-D-Apif}$, ligados nas posições O-2 ou O-3 de unidades de GalpA da HG (CAFFALL & MOHNEN, 2009) (ver Figura 1). As xilogalacturonanas (XGA), estruturalmente, são caracterizadas pela presença de unidades de D-Xylp $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)$, ligadas na posição O-3 de unidades de GalpA da cadeia principal de HG (CAFFALL & MOHNEN, 2009).

3.11.4.5 Arabinanas

A arabinana é um homopolissacarídeo composto basicamente por L-Araf unidas por ligações glicosídicas $\alpha\text{-(1}\rightarrow 5)$ e, dependendo da fonte, pode estar presente na forma linear ou ramificada. Seus pontos de ramificações envolvem, principalmente, a posição O-3, embora haja relatos da ocorrência, em menor frequência, de ligações na posição O-2 (ATMODJO *et al.* 2013).

3.11.4.6 Arabinogalactanas tipo I (AG-I)

As AG-I podem ser encontradas na parede celular na forma livre ou como constituinte do complexo péctico de RG-I. As AG-I são compostas por uma cadeia principal linear de galactanas $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)$ ligadas. Cerca de 20 a 40% das unidades de D-Galp apresentam

substituições, na posição O-3, de cadeias curtas de arabinanas (PÉREZ *et al.* 2000). Essas arabinanas são constituídas de unidades de α -L-Araf (1 \rightarrow 5) ligadas (PÉREZ *et al.* 2000).

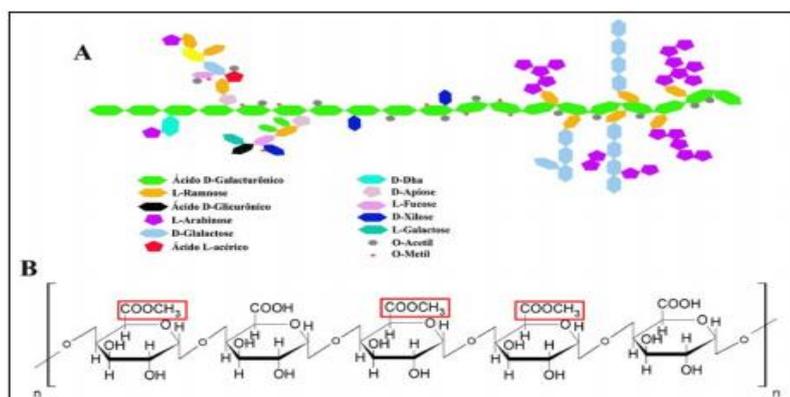
3.11.4.7 Arabinogalactanas tipo II (AG-II) e arabinogalactana-proteínas

As AG-II são as estruturas mais complexas encontradas na cadeia lateral de RG-I. Essas moléculas apresentam cadeia principal de β -D-Galp, unidas por ligações (1 \rightarrow 3), com ramificações curtas de β -D-Galp (1 \rightarrow 6) ligadas, que são terminadas por unidades de α -L-Araf ligadas de forma (1 \rightarrow 3) e/ou (1 \rightarrow 5) (PÉREZ *et al.* 2000). Diferentemente do grupo das AG-I, as AG-II podem estar associadas a proteínas, sendo, então, denominadas de arabinogalactanaproteínas (AGP).

As arabinogalactana-proteínas (AGPs) estão incluídas no grupo de glicoproteínas vegetais ricas em hidroxiprolina, encontradas em vegetais inferiores e superiores de vários grupos taxonômicos (SHOWALTER, 2001). A porção de carboidrato das AGPs que apresenta características de AG-II está organizada em unidades polissacarídicas, que variam de 30 a 150 unidades monossacarídicas (SEIFERT & ROBERTS, 2007). Essas unidades estão ligadas em múltiplos locais no core proteico e são constituídas, principalmente, de Galp e Araf (SEIFERT & ROBERTS, 2007). A porção de carboidratos está O-ligada aos resíduos de hidroxiprolina e, possivelmente, também nos resíduos de serina e treonina (SEIFERT & ROBERTS, 2007).

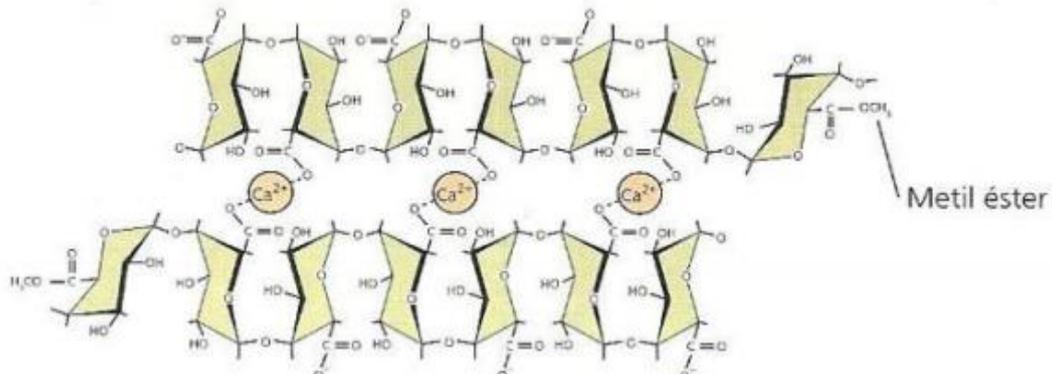
Um método utilizado para distinguir entre os dois tipos de arabinogalactanas (AG-I e AG-II) baseia-se na habilidade desses polissacarídeos se precipitarem na presença do reagente de Yariv (SEYFRIED, M *et al.* 2016).

Figura 13- Estrutura geral da pectina. (A) Visão geral, mostrando ramificações laterais; (B) cadeia central de ácido poligalacturônico com grupos carboxílicos metilados destacados em vermelho.



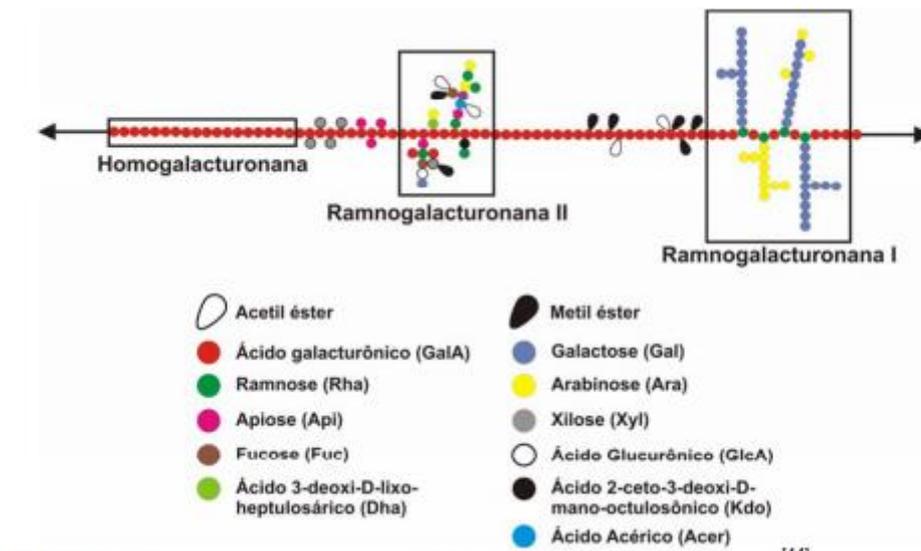
Fonte: CADERNO PEDAGÓGICO, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014. ISSN 1983-0882.

Figura 14- Ligações do Ácido Galacturônico



Fonte: TAIZ; ZEIGER, 2004.

Figura 15- Homogalacturonanas,RGI,RGII.

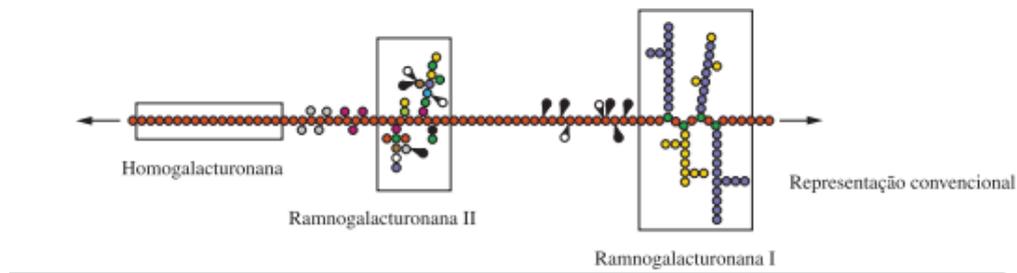


Fonte: POLÍMEROS, vol. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

A xilogalacturonana (XGA) é uma homogalacturonana substituída com xilose ligada na posição 3. O grau de xilosidação pode variar entre 25% (melancia) a 75% (maçã). Essa xilose pode ser adicionalmente substituída em O-4 com outra xilose em ligação β , sendo mais prevalente em tecidos reprodutivos como frutas e semente. A arabinogalactana I (ARA-I) é composta por esqueleto β -D-Galp; resíduos de α -L-Araf podem estar ligados às unidades galactosil na posição 3. A arabinogalactana II (ARA-II) está principalmente associada com proteínas (3-8%), também denominadas arabinogalactanas-proteínas (AGPs). A AG-II é

composta de um esqueleto β -D-Galp 1 \rightarrow 3, contendo curtas cadeias de $[\alpha$ -L-Araf (1 \rightarrow 6) β -D-Galp (1 \rightarrow 6)] $_n$ onde $n = 1, 2$ ou 3 . A parte proteica é rica em prolina, hidroxiprolina, alanina, serina e treonina[4]. A arabinana (ARA) consiste de um esqueleto de α -L-Araf em ligações 1 \rightarrow 5, onde podem estar cadeias laterais de α -L-Araf (1 \rightarrow 2) e α -L-Araf (1 \rightarrow 3) e/ou cadeias laterais de α -L-Araf (1 \rightarrow 3) α -L-Araf (1 \rightarrow 3) [55]. Existe também outra cadeia não representada esquematicamente, a apiogalacturonana (API), HG substituída em O-2 ou O-3 com D-apiofuranose. Está presente em monocotiledôneas aquáticas como Lemna (CANTERI *et al.*, 2012; ONOFRE, VARGAS JÚNIOR, 2016).

Figura16- Alternativa para representação da cadeia pécica

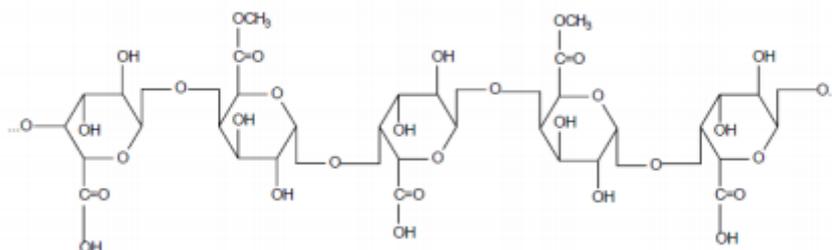


Fonte: CANTERI *et al.*, 2012.

3.11.5 Estrutura Química das Pectinas

Sua estrutura principal, conhecida como esqueleto pécico é constituída por moléculas de ácido galacturônico unidas por ligações α (1,4), que apresentam variados graus de esterificação (DE) dos grupos carboxilas com grupos metila. Entretanto, existem pelo menos 17 monossacarídeos diferentes interconectados por mais de 20 tipos de ligações na estrutura da pectina. Por existirem em diversos tipos de vegetais, as pectinas comerciais na forma de pó apresentam diferenças no seu grau de metoxilação e são classificadas como de alta metoxilação (HM ou AM), com DE maior que 50% (entre 50 e 75%), ou de baixa metoxilação (LM ou BM), com DE inferior a 50% (entre 20 e 45%) (CANTERI *et al.*, 2012; KAYA *et al.*, 2014).

Figura 17- Estrutura da Pectina

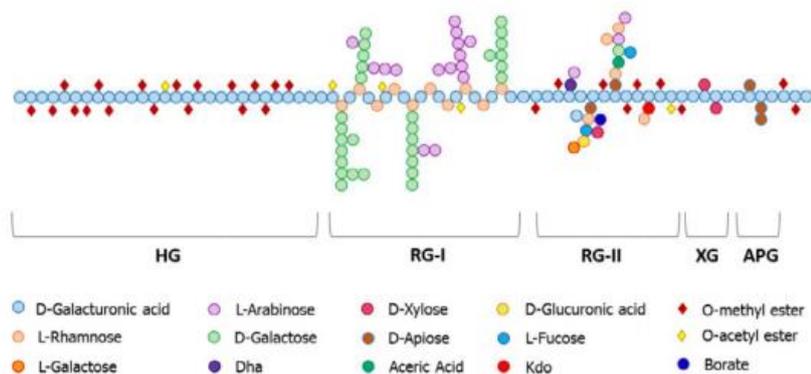


Fonte: COELHO, 2008.

Quando em solução, devido a sua própria estrutura, a pectina apresenta caráter ácido. Existem alguns grupos que podem ser identificados dentro da estrutura da pectina. Os três principais são: a homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG-I) e galacturonanas substituídas (GS) que compreendem as ramnogalacturonanas II (RG-II) – principal componente das GS –, xilogalacturonanas (XG) e apiogalacturonanas (APG) dependendo do tipo de pectina. A HG compõe a maior parte da pectina (60-65%), sendo formada por unidades de ácido α -Dgalacturônico (α -D-GalA) unidas linearmente por ligações 1,4. A RG-I é constituída pela repetição do dissacarídeo [\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow] para o qual variadas cadeias de glucanas (especialmente arabinana e galactana) estão ligadas à unidades de ramnose. Compõe de 20 a 35% das pectinas. A GS é o segmento mais complexo, representando cerca de 10% da estrutura total. A RG-II, seu principal componente consiste de um esqueleto de HG com no mínimo oito unidades monoméricas com até 12 tipos de açúcares em suas cadeias laterais, alguns bastante característicos como a apiose, o ácido acérico, o ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulorásico (DHA) e o ácido 3-deoxi-mano-2-octulosônico (KDO). É possível também encontrar borato ligado à apiose nessa estrutura, o qual pode executar ligações cruzadas entre duas moléculas de pectina dentro da parede celular vegetal (CANTERI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2018).

Segundo SRIAMORNSAK, (2003) a composição e a estrutura das pectinas são difíceis de determinar, pois a mesma pode ser alterada durante o seu isolamento, armazenamento e processamento. Parâmetros como o peso molecular e/ou o conteúdo das subunidades particulares que compõe a cadeia, variam de molécula para molécula, conforme a fonte de obtenção de qualquer amostra de pectina (OLIVEIRA, JAINE, 2019).

Figura 18- Representação esquemática da estrutura da Pectina



Fonte: Adaptado de WANG *et al.*, 2018.

A figura 18 mostra o modelo relatado por WANG *et al.* (2018) para a estrutura da pectina, compreendendo além da HG (com unidades de O-metil éster e O-acetil), RG-I e RG-II, a XG e APG.

3.11.5.1 Propriedades físicas das Pectinas

As propriedades físicas das substâncias pécticas são atribuídas principalmente à sua estrutura e composição química. Neste sentido o grau de metoxilação da pectina e 15 os grupos carboxilas livres (íons carboxilatos) contribuem para o mecanismo de geleificação, sendo a relação [COOCH₃: COO⁻] o principal indicador das suas propriedades funcionais (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

3.11.5.2 Propriedades imunomoduladoras de pectinas e polissacarídeos contendo arabinose e galactose de plantas medicinais

Como vários efeitos imunomoduladores são atribuídos às plantas medicinais (SEYFRIED, M *et al.* 2016), há grande potencial para seu uso no tratamento de disfunções do sistema imunológico (SEYFRIED, M *et al.* 2016). Relatos demonstram que polissacarídeos vegetais, incluindo pectinas e polissacarídeos contendo arabinose e galactose, podem apresentar efeitos sobre a resposta imune celular e humoral (YAMASSAKI *et al.* 2015) e, por isso, podem ser considerados compostos modificadores da resposta biológica (MRB) (DIALLO *et al.* 2001). As moléculas consideradas como MRB pertencem à classe de imunomoduladores e são agentes que modificam a resposta biológica do organismo por meio da estimulação ou inibição do sistema imunológico, podendo resultar em efeitos terapêuticos (SEYFRIED, M *et al.* 2016).

O Sistema Complemento, consiste em um grupo de proteínas séricas (por exemplo, proteínas de C1-C9), que têm por função proteger o organismo de agentes agressores, participando da imunidade inata e adaptativa. Há três diferentes vias do sistema complemento: (1) via clássica, (2) via alternativa e (3) via das lectinas. A via clássica é iniciada por complexos antígenos-anticorpos, enquanto a via das lectinas é iniciada por proteínas solúveis, ligadas a carboidratos, pela lectina ligadora de manose e pelas ficolíinas. Na via alternativa, ocorre a hidrólise espontânea de C3. A partir da clivagem de C3, as três vias se convergem e várias reações em cascata são iniciadas, culminando na formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que promove a lise célula (SEYFRIED, M *et al.* 2016).

Quanto à imunidade celular, vários estudos relatam que as pectinas, bem como as AG-II e as AGPs, podem modular o sistema imunológico, interferindo na atuação de macrófagos

(LENZI *et al.*, 2013; YAMASSAKI *et al.* 2015). Essa capacidade está geralmente relacionada com o estímulo da atividade fagocitária, bem como com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. A ativação também pode resultar no aumento da secreção de citocinas que medeiam a imunidade inata – como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina 1b (IL1b), a interleucina 6 (IL6) e o interferon- γ (IFN- γ) (SEYFRIED, M *et al.* 2016).

Em relação ao mecanismo de ação envolvido na modulação da atividade do sistema complemento por polímeros, (como pectinas, AG-II e AGPs), alguns estudos demonstram que esses polímeros se ligariam ao componente C1q do complemento (YAMADA *et al.*, 1985; DIALLO *et al.*, 2001; SEYFRIED, M *et al.* 2016). Dessa forma, eles induziriam a clivagem do C3, levando à ativação tanto da via clássica quanto da via alternativa; conseqüentemente, provocar-se-ia também a formação do MAC, que é o produto final da ativação do complemento, responsável, por sua vez, pela lise celular (YAMADA *et al.*, 1985; DIALLO *et al.*, 2001; ALBAN *et al.*, 2002; SEYFRIED, M *et al.* 2016). Por outro lado, também foi sugerida a interação com outros componentes do sistema complemento como C2, C3 convertase e C4, constatando que os mecanismos sobre a modulação sobre o sistema complemento parece ser diferentes e diversificados, sendo necessários estudos mais aprofundados para um melhor entendimento sobre estes mecanismos (MICHAELSEN *et al.* 2000; SEYFRIED, M *et al.* 2016).

Em relação à modulação de macrófagos, há escassez de estudos que abordem, especificamente, experimentos correlacionando as características estruturais com o mecanismo de ação de polissacarídeos do tipo pectinas e contendo arabinose e galactose (SEYFRIED, M *et al.* 2016).

Em relação ao mecanismo de ação das pectinas e polissacarídeos contendo arabinose e galactose, fica proposto que esses polímeros vegetais utilizariam os mesmos receptores de macrófagos dos polímeros bacterianos (MELLINGER *et al.*, 2008).

Os possíveis mecanismos de modulação de polímeros vegetais, como pectinas, AGs e AGPs sobre a atividade de macrófagos e/ou sobre o sistema complemento ainda não estão totalmente esclarecidos. Apesar disso, os polissacarídeos vegetais são considerados potenciais candidatos para estudos que visam ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com propriedades moduladoras benéficas para o sistema imunológico (SEYFRIED, M *et al.* 2016)

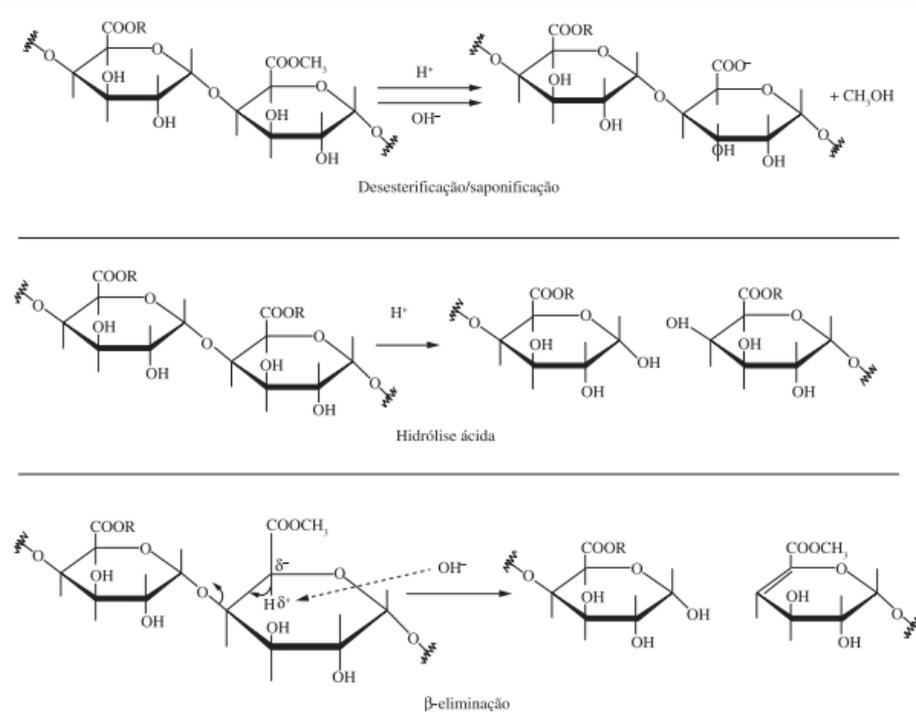
3.11.5.3 Degradação das Pectinas

Em soluções, as substâncias pécnicas podem degradar-se por dois mecanismos químicos principais, esquematizados em três tipos de reação. O primeiro tipo deles é a desesterificação,

com liberação de metanol e formação de pectatos. Em meio ácido (pH entre 1 a 3), em temperaturas inferiores a 10 °C, predominam as desesterificações. O outro mecanismo, denominado de despolimerização (diminuição do tamanho da cadeia polimérica) pode acontecer por hidrólise (ácida ou enzimática) das ligações α (1 \rightarrow 4), ou ainda por reações de β -eliminação (CANTERI MHG, 2012).

As substâncias pécicas são degradadas igualmente por enzimas sintetizadas por vegetais ou por microrganismos. Nesse caso, a degradação pode seguir duas vias principais: desmetilação preliminar pela pectina-esterase, seguida da hidrólise ácida das ligações α (1 \rightarrow 4) pelas poligalacturonases; despolimerização direta das pectinas por reações também de β -eliminação sob ação das pectinas liases e pectato liases de origem microbiana. As condições de extração apresentam importante influência sobre a natureza da pectina, tanto nos aspectos quantitativos quanto qualitativos, podendo ser modificadas (pH, temperatura, tempo) resultando em alterações no rendimento, na capacidade geleificante e no grau de esterificação (DE) (CANTERI MHG, 2012).

Figura 19- Principais modificações nas substâncias pécicas por efeito de temperatura



Fonte: POLÍMEROS, vol. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

3.11.5.4 Caracterização de Substâncias Pécicas

Existem três fatores principais relacionados à sua natureza que dificultam o estudo das moléculas pécicas: caráter polimérico e presença de cargas elétricas, que influenciam a solubilidade, a degradação química, o comportamento hidrodinâmico em dispersão e iônico, na cromatografia; estrutura polissacarídica heteropolimérica, comportando uma gama variada de unidades estruturais, com diferentes substituintes, formas, anomérias e tipos de ligação, o que dificulta sua análise estrutural e problemas ligados à extração, associados à insolubilização dos polissacarídeos pelo tratamento para inativação enzimática e aos agentes de extração e protocolos de obtenção com pectinas de diferentes características (CANTERI M.H.G, 2012).

O homogalacturonano (HG) e ramnogalacturonano I (RG-I) são as estruturas principais da pectina, sendo compostos principalmente de ácido Dgalacturônico, L-ramnose e açúcares neutros (FRACASSO, 2015).

3.11.5.5 Caracterização física da pectina

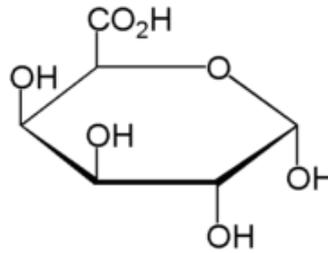
3.11.5.5.1 Determinação do teor de cinzas e umidade

O conteúdo de massa seca da pectina é determinado através da secagem das amostras em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 8 horas. Já o teor total de cinzas da pectina é determinado medindo-se o resíduo obtido após incineração em mufla Termo Scientific em $650 \pm 5^\circ\text{C}$ por um período de 4 horas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3.11.5.5.2 Teor de ácido galacturônico

O teor de ácido galacturônico é o principal parâmetro de qualidade da pectina pois, de acordo com a FAO, um polímero pécico deve apresentar no mínimo 65 % de ácido galacturônico para ser considerada pectina comercial (MARENDA, F.R, 2015).

Segundo KLIEMANN (2006), o conteúdo do ácido galacturônico é determinado a partir da metodologia proposta por BOCHEK *et al* 2001), que se baseava na titulação potenciométrica, onde o ponto de viragem é determinado pela variação do p^{H} , até que atingisse o valor de 8,5, com potenciômetro Quimis. Já segundo FILISETTI- COZZI E CARPITA (1991), onde o teor de ácido galacturônico é determinado por leitura colorimétrica em espectrofotômetro Hewlett- Packard, modelo 8453, onde a absorvância máxima em comprimento de ondas de 525 nm e comparado em uma curva analítica preparada com uma solução padrão de ácido galacturônico em concentrações de 0,5200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 20- Estrutura do Ácido Galacturônico

Fonte: KHAN; BIBI; ZEB, 2015.

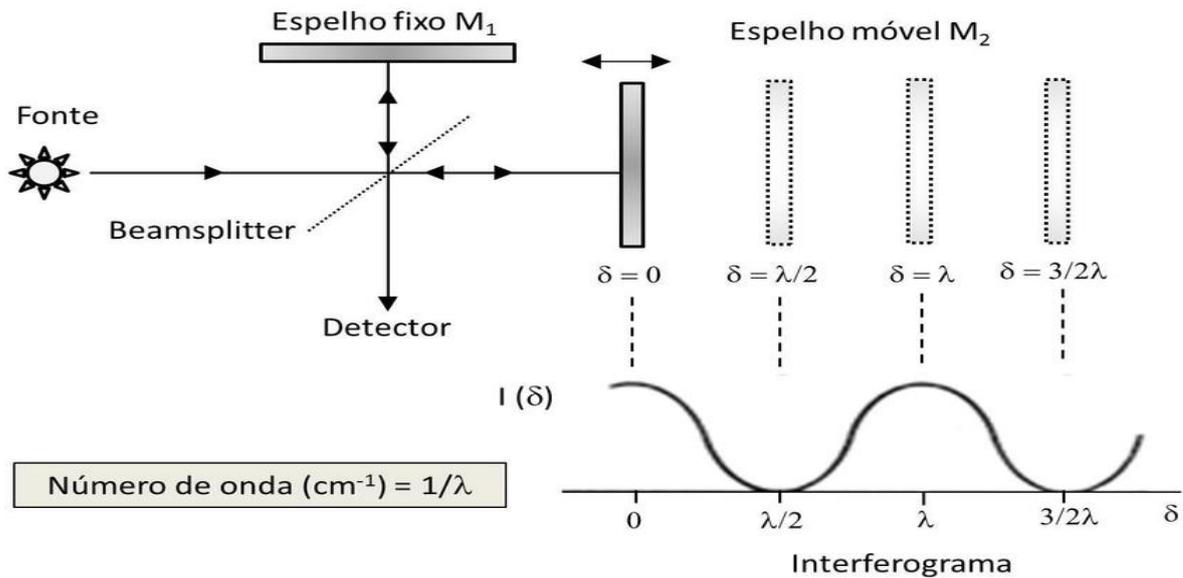
3.11.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier / refletância total atenuada (ATR / FTIR)

Estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Em uma molécula, o número de vibrações, a descrição dos modos vibracionais e sua atividade em cada tipo de espectroscopia vibracional (infravermelho e Raman) podem ser previstas a partir da simetria da molécula e da aplicação da teoria de grupo, tendo como condição a absorção da radiação infravermelha, para que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula, que é consequência de seu movimento vibracional ou rotacional.

3.11.6.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A base de qualquer espectrômetro FTIR é o interferômetro de Michelson (figura 21). Nesse sistema, a radiação de uma fonte monocromática hipotética é dividida em dois feixes, cada um correspondendo idealmente a 50% do original, no "beamsplitter" (divisor de feixe). Um dos feixes (A) segue em direção ao espelho de posição fixa no qual reflete de volta para o "beamsplitter", onde parte deste feixe reflete de volta para a fonte e parte vai para o detector.

Figura 21- Diagrama mostrando os principais componentes do Espectrofotômetro FTIR



Fonte: BARCELOS, I. D. 2015.

Portanto, à medida que o espelho móvel percorre determinada distância, um interferograma é formado. A intensidade da radiação que chega no detector, $I(\delta)$, varia como uma função cosseno da retardação óptica δ .

$$I(\delta) = B(\nu)\cos(2\pi\delta/\lambda) \quad \text{equação 1}$$

$$I(\delta) = B(\nu) \cos(2\pi\nu\delta) \quad \text{equação 2}$$

É necessário, então, que um tratamento matemático, chamado apodização, seja feito no interferograma para que este possa ser convertido em espectro. As duas maneiras mais comuns, disponíveis na maioria dos instrumentos FTIR, são as apodizações boxcar e triangular...

A análise ATR-FTIR é usada para identificar os principais grupos funcionais, além de auxiliar na determinação do grau de esterificação, na pectina. Para isso é utilizado um espectrômetro Bruker Tensor 27 usando o total atenuado acessório de refletância (Platinum ATR). Os espectros foram registrados na faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e 20 varreduras.

3.11.6.2 Grau de Acetilação

Determinado à partir da Metodologia proposta por Ranganna(1977), onde utiliza-se o método de Titulação com NAOH 0,01N com indicador vermelho Fenol.

3.11.6.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H NMR)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear está baseada na medida da absorção da radiação eletromagnética na região de radiofrequência (4 – 900 MHz), por um núcleo atômico, com spin diferente de zero, sob a influência de um campo magnético. A utilização da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), bem como a versatilidade dos equipamentos tem avançado consideravelmente, desde a primeira identificação de sinais em um espectro em 1945 por Bloch, Purcell e colaboradores. O fenômeno de ressonância magnética nuclear está relacionado com as características intrínsecas dos spins nucleares, e tem possibilitado uma melhor compreensão das propriedades físico-químicas dos núcleos e das moléculas (LIMA, V.J, 2008).

Para que ocorra o fenômeno de RMN é necessário perturbar o sistema através da aplicação de um pulso de radiofrequência, perpendicular ao campo magnético estático (LIMA, V.J, 2008).

A análise de ^1H NMR foi usada para elucidar a presença dos principais grupos funcionais e ligações químicas presentes na estrutura da pectina, e analisado em Espectrofotômetro Bruker Avance 300, operando a 400 MHz com uma sonda de 5 mm.

3.11.6.4 Potencial de Zeta

O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade. Avalia a estabilidade da Pectina em solução, utilizando o Zetasizer nano Malven Instruments, onde um volume da amostra é colocado em uma célula capilar DTS 1060 a 25°C, sendo essa análise realizada em duplicata (RIBEIRO, A.C.B, 2017).

3.11.6.5 Reologia

O estudo reológico é realizado em soluções aquosas de Pectina de concentrações entre 0,4 à 1,0%. O equipamento utilizado é o Reômetro da TA Instrumento modelo AR 550, com um sensor do tipo cone-placa (diâmetro de 40mm), fluxo contínuo de 0,1 a 1000 s^{-1} e frequência de 0,1 Hz a 25°C (RIBEIRO, A.C.B, 2017).

3.11.6.6 Determinação dos Fenóis Totais

Os compostos fenólicos são compostos produzidos a partir do metabolismo secundários dos vegetais e possuem importante papel no crescimento, desenvolvimento, fotossíntese e respiração desses organismos (RIBEIRO, A.C.B, 2017). O conteúdo fenólico é conhecido como antioxidante, sendo determinado pelo método descrito por HOSSEINI *et al*, com poucas modificações, e são analisadas em espectrofotômetro a 765 nm, construindo-se uma curva analítica de absorbância em função da concentração de ácido gálico. Os fenóis serão relatados em equivalente de ácido gálico (mg GAE/g pectina).

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

3.11.7 Testes de atividade antioxidante *in vitro*

Nos dias de hoje dá-se grande atenção ao estudo dos antioxidantes devido, principalmente, aos efeitos causados pelos radicais livres no organismo. A oxidação é essencial na vida aeróbica e, assim, os agentes oxidantes são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Radical livre é uma estrutura química que apresenta um desemparelhamento de elétrons em um de seus orbitais, o que o torna instável, muito reativo e com uma capacidade de se combinar inespecificamente com qualquer estrutura celular. Para evitar que os radicais livres atuem de maneira prejudicial às membranas biológicas, os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante que envolve desde as defesas internas como, por exemplo, enzimas, até a dieta. O equilíbrio entre os agentes oxidantes e as defesas antioxidantes é vital para a manutenção do metabolismo celular, uma vez que parte destes agentes são criados endogenamente no metabolismo do O₂ (SILVA, A.O,2014).

Um composto antioxidante é aquele que mesmo em baixas concentrações, quando comparado ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação dos mesmos. Estes antioxidantes podem ser enzimas ou micromoléculas advindas do próprio organismo ou da dieta (SILVA, A.O, 2014).

3.11.7.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

Tem como objetivo quantificar a oxidação de componentes lipofílicos e hidrofílicos, sendo possível identificar a capacidade antioxidante total da amostra. A capacidade antioxidante da amostra foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%) em relação à absorvância da vitamina C (200 µg/mL em metanol), utilizada como padrão antioxidante para este ensaio.

A atividade antioxidante total foi calculada pela Equação 3: TAA (%)

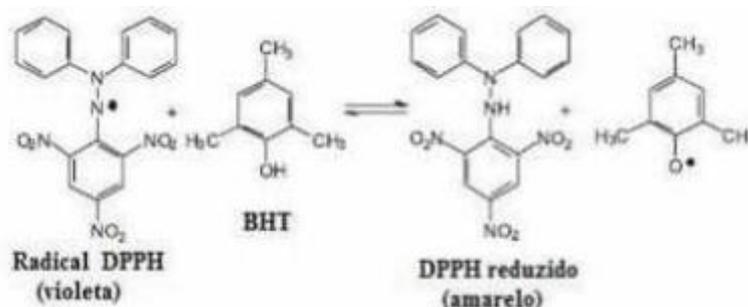
$$= [(As - Ab) / (Aaa - Ab)] \times 100\%, \text{ onde: } Ab = \text{absorção do branco};$$

As: absorção da amostra; Aaa = absorção do ácido ascórbico.

3.11.7.2 Atividade sequestrante de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 512-520 nm. A redução do DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorvância durante a reação. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes, podendo ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato num certo período de tempo (CUPIRA, N.R, 2012).

Figura 22- Esquema da estrutura química do DPPH e reação com um antioxidante



Fonte: TIVERON, 2010.

3.11.7.3 Atividade de eliminação do cátion do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico ácido (ABTS))

É o método proposto para rastrear e quantificar ingredientes antioxidantes de rastreamento de produtos naturais (HUFEN MA *et al*, 2019). Já se passaram mais de duas décadas desde um dos métodos antioxidantes mais amplamente usados, medição de capacidade antioxidante equivalente ao trolox melhorada (TEAC), foi inventado. Este ensaio aplica o cátion radical ABTS • + (2,20 azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) como um radical modelo e difere da versão inicial do ensaio TEAC em um iniciador radical-persulfato de potássio (PP) em vez de metamioglobina / H₂O₂. Um artigo publicado recentemente traz uma visão geral dos ensaios ABTS / TEAC. ABTS + antioxidante à base de cátion radical., abordagens de capacidade, incluindo diferentes métodos de geração ABTS, estratégias de quantificação e desenho experimental, entre outros, bem como uma considerável coleta de dados de valores TEAC obtidos usando o cromogênio ABTS (IGOR R. ILYASOV, 2019).

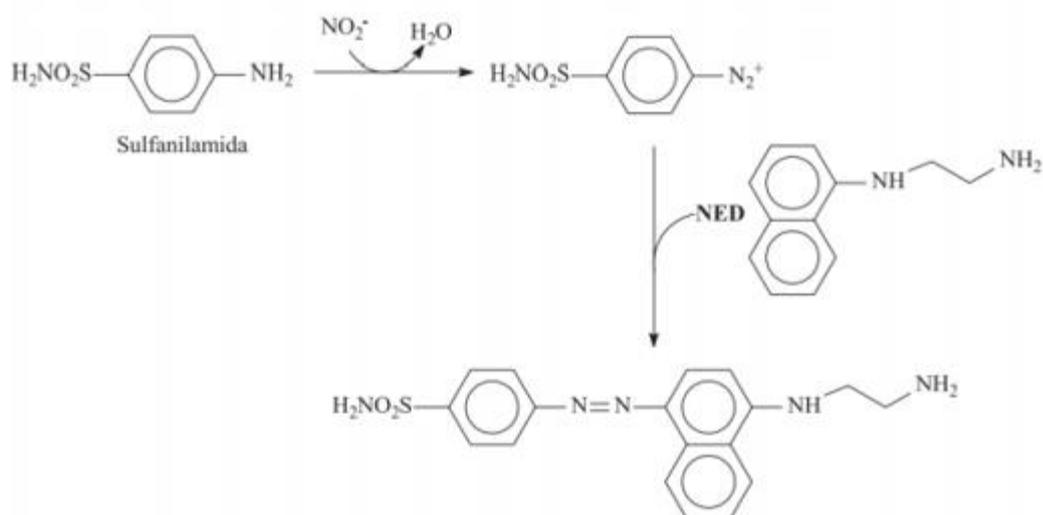
Pode-se afirmar com segurança que o ensaio ABTS / PP mede apenas a capacidade antioxidante, não estima a reatividade antioxidante ou as taxas de inibição simultâneas, e tem algumas deficiências (IGOR R. ILYASOV, 2019).

3.11.7.4 Atividade de eliminação de radicais de óxido nítrico (NO)

Os métodos sequenciais geralmente são baseados na determinação espectrofotométrica, do íon nitrito via reação de Griess.

Os métodos espectrofotométricos são os mais amplamente utilizados na determinação dos íons nitritos e nitratos, devido aos baixos limites de detecção e simplicidade. Sendo mais utilizada a reação de Griess, na qual o íon nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) formando um diazo composto, conforme apresentado na Figura 1, de coloração vermelha que apresenta um máximo de absorção em torno de 540 nm (SANTOS, L.O, 2013).

Figura 23- Mecanismo de reação envolvida no método de Griess



Fonte: Quim. Nova, Vol. 29, No. 5, 1114-1120, 2006.

3.12 APLICAÇÕES DAS PECTINAS

Polímeros amplamente utilizados como agente gelificante, emulsificante e estabilizante nas indústrias alimentícias (na produção de goma, geleias, produtos lácteos, entre outros) (CANTERI MHG, 2012) e com aplicações crescentes na indústria farmacêutica (como fibras dietéticas solúveis com efeitos benéficos na redução dos níveis de colesterol, lipoproteínas e ácidos biliares) (Piedade J *et al*, 2003; Hur SJ *et al*, 2013). As substâncias pécicas podem estar presentes na formulação de medicamentos associadas a polímeros naturais ou sintéticos, como material de revestimento de formas farmacêuticas e em sistemas terapêuticos específicos, naturais ou como compostos derivados, facilitando a liberação de fármacos devido à sua baixa toxicidade, baixo custo e alta estabilidade (OLIVEIRA, F.S, 2019).

A pectina é um polieletrólito e tem sido extensivamente usada em várias aplicações industriais como embalagens, revestimento (ou filmes de proteção para transporte) e diferentes outros materiais. Tem ainda sido usada para fabricação de dispositivos para liberação controlada de fármacos, encapsulamento de fármacos com atividades farmacológicas, em indústrias de alimentos como geleificantes, estabilizante, espessante, emulsificante, texturizador, e também utilizada na área de biomateriais para produção de matrizes poliméricas e filmes (OLIVEIRA, JAINE, 2019). Em infusões e decocções, as pectinas, bem como outros polissacarídeos com características mucilaginosas, têm como efeito reduzir a irritação física ou química. Desta forma, as pectinas exercem, assim, uma ação favorável contra as inflamações das mucosas, especialmente as das vias respiratórias e digestivas. Como uso tópico, utiliza-se

como cataplasmas, por conservarem por mais tempo o calor úmido. Também atuam indiretamente como laxativos, por absorverem grande quantidade de água, evitando o endurecimento das fezes (SEYFRIED, M. *et al*, 2016).

3.13 PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular vegetal compreende uma estrutura complexa e dinâmica que executa uma série de funções essenciais. Essa estrutura estabelece o tamanho e a forma final da célula, exerce a comunicação intercelular e ainda desempenha importante papel na interação de plantas com microrganismos – agindo na defesa contra possíveis patógenos e variações adversas ambientais (CAFFALL & MOHNEN, 2009). Além disso, sua estrutura é continuamente modificada para acomodar os estádios de desenvolvimento da célula e as condições ambientais (CAFFALL & MOHNEN, 2009).

Os polissacarídeos e glicoconjugados presentes na parede celular vegetal têm sido bem caracterizados estruturalmente. A parede celular vegetal consiste em uma porção microfibrilar, formada por celulose, que é seu principal componente (KEEGSTRA, 2010). Além da celulose, a parede celular vegetal contém vários polissacarídeos, localizados na matriz extracelular, os quais são, em geral, agrupados em duas principais categorias: (1) hemiceluloses e (2) pectinas (KEEGSTRA, 2010).

A parede celular vegetal também contém muitas proteínas e glicoconjugados, incluindo várias enzimas e proteínas estruturais. Como exemplo, podem ser citadas as arabinogalactana-proteínas, moléculas estruturalmente complexas, encontradas na membrana plasmática e na parede celular vegetal, as quais apresentam importantes funções em processos de reconhecimento e sinalização celular (ELLIS *et al.* 2010).

3.13.1 Celulose e hemiceluloses

A celulose consiste em cadeias de monômeros de glucose (Glc_p) na configuração D, com ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4), que formam polímeros lineares e insolúveis em água (KEEGSTRA, 2010). As cadeias lineares interagem entre si, através de ligações de hidrogênio, formando microfibrilas longas e cristalinas (KEEGSTRA, 2010). Essa estrutura é resistente a grandes trações e representa cerca de 20% a 30% da matéria seca da parede celular primária, podendo ocupar até 15% dessa região em volume, enquanto que, em paredes celulares secundárias, pode atingir de 40 a 90% do peso da biomassa dessa estrutura (PÉREZ &

MAZEAU, 2005). As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polímeros que apresentam uma cadeia principal composta por unidades de glucose (D-Glcp), manose (D-Manp) ou xilose (D-Xylp) β -(1 \rightarrow 4), ligadas em configuração equatorial no C1 e C4 (OCHOA-VILARREAL *et al.* 2012). A classificação das hemiceluloses é feita de acordo com o monossacarídeo majoritário presente na cadeia principal. Dessa forma, os principais tipos de polissacarídeos encontrados nesse grupo incluem as xilanas, as arabinoxilanas, as galactomananas, as glucomananas, as xiloglucanas, as mananas e as β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) glucanas (SCHELLER & ULVSKOV, 2010). As hemiceluloses estão presentes no meio extracelular, conectadas, através de interações moleculares, com as microfibrilas de celulose, formando a matriz da parede celular. Entretanto, esses polímeros, ainda podem atuar como moléculas sinalizadoras ou como precursores delas, sendo possível, também, agir na forma de substâncias de reserva (SCHELLER & ULVSKOV, 2010).

A pectina comercial ATM (Alto teor de metoxilação), vem sendo utilizada como agente gelificante na elaboração de geleias e compotas, agente espessante, flocculante, estabilizador, em confecções de bebidas de frutas e dietéticas, em glacês e recheios de produtos de panificação, além de molhos para saladas, e substituto de gordura na produção de manteiga, margarina, patê, etc (SMITH e HONG-SHUM, 2003). A pectina de baixo teor de metoxilação (BTM) é utilizada na formulação de doces em massa de baixo valor calórico (light) (CHRISTENSEN, 1986). Além do uso em indústria alimentícia, a pectina tem aplicações na indústria farmacêutica, onde atua principalmente como uma espécie de fibra alimentar reduzindo os níveis de colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade) no sangue. MIETTINEN e TARPILA (1977), reportaram uma redução de 13% no nível do colesterol de pessoas de várias idades com uma dieta de 40-50 g/dia de pectina durante duas semanas. JENKINS, NEWTON *et al.* (1975), também obtiveram resultados significativos na redução de colesterol (12-18%) com uma dieta de 36 g/dia de pectina durante duas semanas de tratamento. (VASCONCELOS, J.C.B, 2019). Estimula a resposta imune, além disso, as pectinas agem de forma profilática contra envenenamento com cátions tóxicos, como os metálicos. Outra ação importante das pectinas é a redução do tempo de coagulação. Em virtude da sua capacidade de reter líquidos, as pectinas promovem a sensação de saciedade o que diminui o consumo de alimentos auxiliando no emagrecimento (SILVA, A.S, 2014).

3.13.2 Esterificação da pectina

As pectinas possuem a propriedade de formar gel quando entram em contato com a água, porém, esse processo depende de alguns fatores, como, pH do meio, temperatura, presença de íons, concentração de açúcares e grau de metoxilação.

O grau de esterificação é considerado um parâmetro que caracteriza os polímeros de pectina, já que é específico de cada planta, além de ser influenciado pela degradação da pectina durante o amadurecimento de frutas e vegetais, pela ação da enzima pectinesterase, e influenciado pelo processo de extração. O valor de cada polímero para o grau de esterificação representa a quantidade de seus grupos carboxila da cadeia principal de ácido galacturônico que se encontram esterificados com grupo acetil ou mais comumente com grupo metil. Pectinas classificadas como de alto grau de esterificação formam gel em pH ácido ($< 3,5$) e na presença de açúcar; já as pectinas consideradas de baixo grau de esterificação formam gel em valores mais altos de pH e na presença de íons divalente, como o Ca^{2+} . A formação de gel ocorre quando a cadeia de ácido galacturônico interage com a água formando estruturas tridimensionais mantendo-a presa em sua estrutura. Quando as interações são suficientemente estáveis ocorre a formação e manutenção do gel (YAMASHITA, B.B.V.G, 2017).

O grau de metoxilação (GM) é a razão entre os grupos carboxilas e carboxilatos presentes na estrutura da pectina (KIM *et al.*, 2016; HOSSEINI *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2015). De acordo com o grau de metoxilação apresentado, as pectinas podem ser classificadas como sendo de alta metoxilação (GM $>$ 50%) e de baixa metoxilação (GM $<$ 50%). Pectinas com alto grau de metoxilação formam géis na faixa de pH 2,5 – 3,5 e necessitam de grandes quantidades de açúcares no meio (55 – 75%), formando géis por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que ocorrem entre os metil-ésteres. Já as pectinas de baixa metoxilação formam gel em pH 3 – 4,5, não necessitam de grande quantidade de açúcar, mas sendo imprescindível a presença de íons bivalentes, como o Ca^{+2} . O mecanismo proposto para a geleificação da pectina de baixa metoxilação baseia-se no modelo “caixa de ovo”, com formação de redes de gel através de ligações cruzadas iônicas com cátions divalentes, normalmente cálcio. (VERONOVSKI *et al.*, 2014; ESPITIA *et al.*, 2014).

A pectina possui diversas aplicações sendo bastante utilizada pela indústria alimentícia e farmacêutica. É utilizada para prevenir a flotação em produtos derivados de frutas, garantir estabilidade proteica, além de proporcionar melhorias na textura e maciez do alimento junto ao

aumento do volume. Quanto aos efeitos farmacológicos, as substâncias pécticas atuam benéficamente no equilíbrio hídrico e na motilidade intestinal (CANTERI *et al.*, 2012).

A pectina do mesmo modo pode ser aplicada na produção de diversos produtos como biofilmes, adesivos, espumas e plastificantes, além de materiais para implantes biomédicos e liberação de fármaco (CANTERI *et al.*, 2012), o que justifica maiores estudos e pesquisas a respeito de suas propriedades terapêuticas.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Crataeva tapia* na fase adulta foram coletadas em janeiro de 2020 no local da Cidade Universitária, Recife, Brasil (8° 2 '50.312' 'S, 34° 56' 58.364 'W). Foram selecionadas cerca de 100 folhas verdes e saudáveis em três locais diferentes; folhas visualmente intactas, livres de pragas, doenças ou cor alterada. Uma amostra de voucher foi levada para ser identificada pela professora Marlene Barbosa e após a identificação, foi depositada no Herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco sob o número 87511.

4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PECTINA: EXTRAÇÃO DE PECTINA

Para extração de pectina, as folhas de *C. tapia* (100 g) foram submetidas a uma extração aquosa, na proporção (g / mL) de 1: 1 em 2 L de tanque agitado a (60 ° C / 1200 rpm / 4 h). O líquido obtido nas etapas de extração foi sujeito a precipitação com etanol a 100%. O precipitado de pectina sólida foi seco a 70 ° C durante aproximadamente 24 h.

4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PECTINA USANDO ATR-FTIR

A análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de *C. tapia* pectina foi realizada em um espectrômetro Bruker Tensor 27 usando o acessório de refletância total atenuado (Platinum ATR). Os espectros foram registrados na faixa espectral de 4000 a 500 cm⁻¹, com uma resolução de 2 cm⁻¹ e 20 varreduras.

4.4 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

Diferentes ensaios antioxidantes foram realizados usando concentrações decrescentes de pectina (1000 a 3,9 $\mu\text{g} / \text{mL}$). A atividade antioxidante total (TAA), a atividade de seqüestro de radicais livres de DPPH, a atividade de eliminação de cátions de radicais ABTS e o teste de eliminação de radicais de óxido nítrico foram realizados de acordo com Cruz-Filho et al. Protocolos (2019). Para determinação do poder redutor, cada concentração de pectina foi misturada com tampão fosfato (2,5 mL, 0,2 M, pH 6,6) e ferricianeto de potássio (2,5 mL, 1%, p / v), incubados a 50 °C por 20 min, para descobrir a concentração de ferrocianeto férrico, segundo Aadil et al. (2014) protocolo. Para a atividade quelante de ferro (Fe^{2+}), cada amostra de pectina foi misturada com metanol e FeCl_2 (250 mM), incubada a 25 °C por 10 min e, em seguida, foi adicionada ferrozina (2 mM) a esta solução (Barapatre et al., 2016). A capacidade quelante de Fe^{2+} foi apresentada em% quelante e calculada da seguinte forma: Fe^{2+} capacidade quelante (%) = $[\text{A}_0 - (\text{A}_1 - \text{A}_2)] / \text{A}_0 \times 100$ onde A_0 representa absorvância do controle, A_1 para absorvância das amostras ou padrão e A_2 para absorvância do branco. O EDTA foi usado como referência. Para todos os ensaios, o ácido ascórbico foi utilizado como padrão.

4.5 ENSAIOS CITOTÓXICOS E IMUNOLÓGICOS: PREPARAÇÃO, CULTURA E ESTIMULAÇÃO IN VITRO DE PBMCS

O isolamento de linfócitos e monócitos das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi realizado de acordo com Melo et al. (2011). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras de sangue foram coletadas somente depois que todos os voluntários assinaram um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”. Após três centrifugações, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer, utilizando a solução de azul de tripano. As células foram usadas apenas quando a viabilidade era > 95%. As PBMCS foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10% (p / v) em placas de 24 poços a uma densidade de 10⁶ células / poço. Para análise de viabilidade, as células foram tratadas com a pectina em diferentes concentrações e o estímulo foi mantido por 24 h.

4.6 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE

Como o PBMC foi tratado por 24 horas e a morte celular foi analisada com o iodeto de propídio de acordo com o protocolo descrito por Santos et al. (2018). Uma citometria de fluxo foi realizada na plataforma FACS Calibur (BD Biosciences-EUA®) e os resultados foram analisados no Flowing Software 2.5.1®

4.7 MEDIÇÃO DE CITOCINAS E PRODUÇÃO DE NITRITOS

As citocinas e nitrito foram quantificados em sobrenadantes de culturas PBMC tratadas com a pectina (10 µg / mL) por 24 horas de incubação. A avaliação das citocinas foi realizada usando o kit de citocinas Th1 / Th2 humano Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences-USA) para detecção das interleucinas IL-2, -4, -6, -10, TNF-α e IFN- γ como descrito por Santos et al. (2018a). Os dados foram adquiridos na plataforma FACS Calibur (BD Biosciences-USA) e os resultados foram analisados no Flowing Software 2.5.1. A concentração de nitrito foi estimada pelo método de Griess (Ding et al., 1988). Uma curva padrão ($y = 0,007x + 0,0256 / R^2 = 0,9978 / 3,12-400 \mu\text{mol}$) foi encontrada no ensaio. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-EUA) a 595 nm.

4.8 ENSAIO DE IMUNOFENOTIPAGEM

Os ensaios de imunofenotipagem linfocitária foram realizados de acordo com Santos *et al.* (2018). Os anticorpos monoclonais utilizados foram anti-CD4-PerCP e anti-CD8-FITC (BD®). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACS Calibur (BD Biosciences-USA®) e os resultados foram analisados usando o Flowing Software 2.5.1®.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições ± desvio padrão da média. A análise estatística foi realizada através da análise de variância e as diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$), e todos os resultados foram analisados usando o Flowing Software 2.5.1®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES *IN VITRO*

A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras de eliminar os radicais livres e determinada através dos ensaios de DPPH, sequestrando os radicais peróxidos, ABTS, AAT, AQ, AR e NO. Os testes não mostraram E50 (concentração em que 50% do radical é capturado). A pectina apresentou capacidade antioxidante moderada para os testes ABTS, DPPH e TAA, $41,16 \pm 0,30$, $25,9 \pm 0,01$ e $20,4 \pm 0,20\%$ (0,5 mg), respectivamente (**Tabela S1**).

Table S1. Antioxidant activity of pectin at concentrations of 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Antioxidant assays	Pectin	Ascorbic acid
	% (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	% (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
TAA	20.4 ± 0.20	100 ± 0.00
ABTS	41.16 ± 0.30	90.47 ± 0.34
AQ	ND	80.3 ± 0.10
AR	ND	76.50 ± 0.90
DPPH	25.9 ± 0.01	91.05 ± 0.17
NO	7.6 ± 1.95	95.42 ± 0.80
Kidnapping (H_2O_2)	ND	ND

Mean \pm deviation
 ND: Not detected

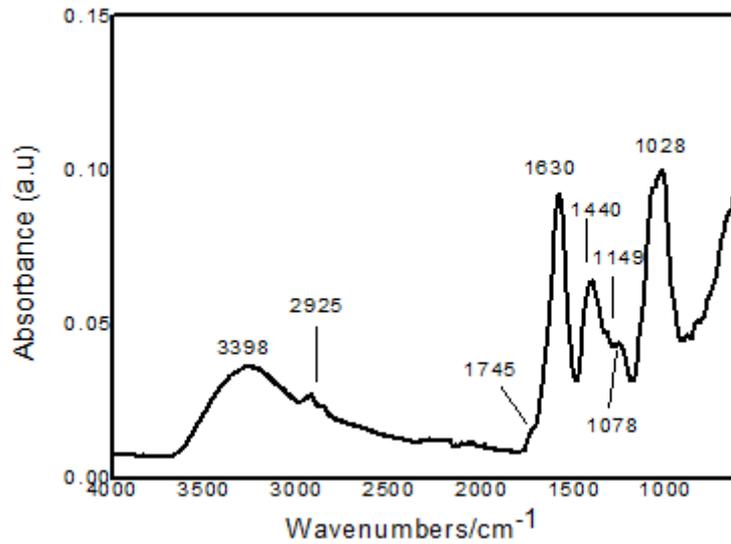
A atividade antioxidante promovida por diferentes pectinas está diretamente relacionada à sua estrutura química, ou seja, a composição dos monossacarídeos, teor de ácido galacturônico, peso molecular, tipo de elo glicosídico da cadeia principal, grau de esterificação, flexibilidade das configurações de além da presença de compostos fenólicos provenientes do processo de extração. Outros autores descobriram que as pectinas podem ser usadas como agentes antioxidantes.

Vários estudos mostram que as pectinas são amplamente descritas por seu potencial antioxidante (NUZZO, *et al.* 2020; MOREIRA, *et al.* 2008). Semelhante aos nossos resultados, as pectinas isoladas das passas de batata *Daucus carota* e *Ipomoea* são relatadas na literatura por apresentarem capacidade antioxidante (ENCALADA, *et al.* 2019; OGUTU e TAI-HUA, 2017).

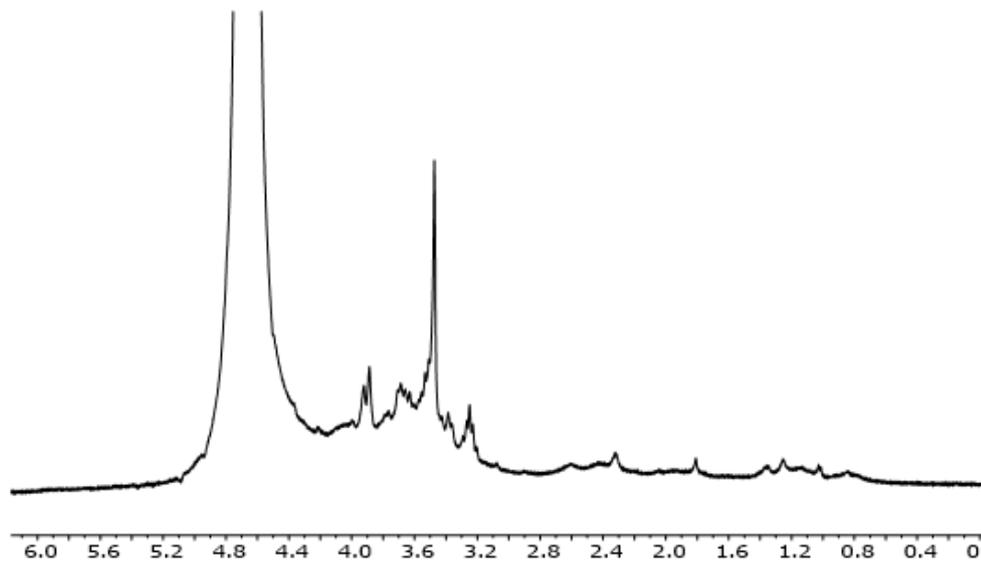
A pectina apresentou capacidade antioxidante moderada para os testes ABTS ($41,16 \pm 0,30$), DPPH ($25,9 \pm 0,01$) e TAA ($20,4 \pm 0,20\%$) (0,5 mg).

5.1.1 Análise do espectro do FTIR e do RMN do ^1H

5.1.1.1 Espectro FTIR para a pectina das folhas de *Crataeva tapia*



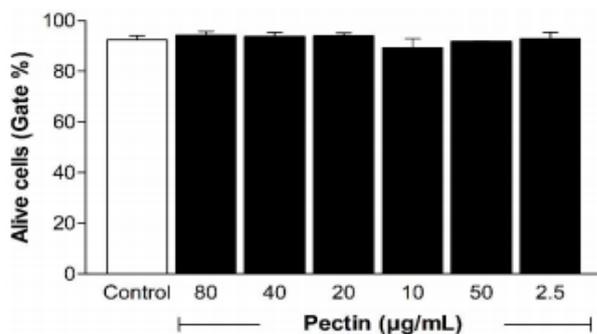
5.1.1.2 Espectro de RMN de ^1H para pectina extraída de folhas de *Crataeva tapia*.



5.2 CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade *in vitro* mostrou que a pectina, mesmo nas concentrações mais altas, não induziu morte celular significativa. Os resultados de citotoxicidade, expressos como porcentagem de células vivas, mostraram que mais de 85% das PBMCs humanas permaneceram vivas após o tratamento ser observado no **Gráfico 1**. Com base nesse resultado, optamos por utilizar a concentração de 10 µg / mL para testes imunoestimulantes. Estudos disponíveis na literatura mostram que, como pectinas isoladas, elas não apresentam um perfil de toxicidade contra células animais (Costa, et al. 2016), corroborando nossos resultados com os estudos relatados por LEFSIH, *et al.* (2018) e LIONEL *et al.* (2016) mostraram que a pectina *Opuntia ficus*, indica e a Citrus pectina não apresentam um perfil de citotoxicidade na cultura normal de células animais.

Gráfico 1: Viabilidade de PBMCs em humanos tratados com pectina de folhas de *C. tapia* em diferentes concentrações. A pectina não promoveu morte celular significativa. As barras verticais representam a média de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata.

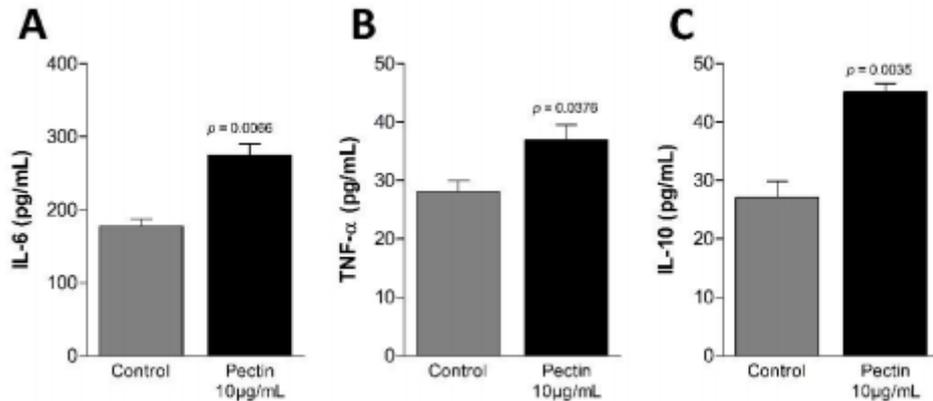


Os resultados de citotoxicidade mostraram que mais de 85% das PBMCs humanas permaneceram vivas após o tratamento.

5.3 CITOCINAS, PRODUÇÃO DE NITRITOS E IMUNOFENOTIPAGEM

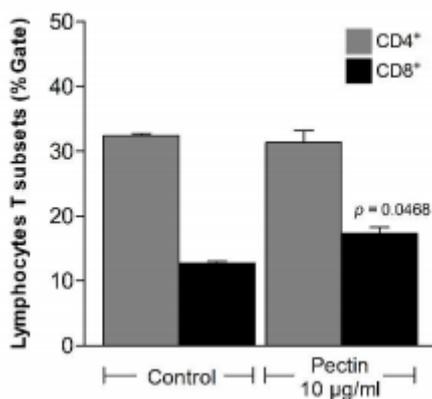
A produção de citocinas foi determinada para investigar os efeitos imunoestimuladores promovidos pela pectina (10 µg / mL) em culturas de células. Entre as citocinas dosadas, a pectina foi capaz de induzir apenas a produção de IL-6, IL-10 e TNF-α em níveis significativos (**Gráfico 2**). O resultado da medida dos níveis de NO, bem como as citocinas IFN, IL-2, IL-4 e IL-17, não apresentaram resultados significativos. Além disso, os resultados da imunofenotipagem mostraram que a pectina induziu a ativação de uma resposta CD8 + significativa (**Gráfico 3**).

Gráfico 2: Efeito imunestimulador da pectina de folhas de *C. tapia* em PBMCs humanos culturas em 24 h de incubação. As barras verticais representam a média de duas experimentos realizados em quadruplicata.



Entre as citocinas dosadas, a pectina foi capaz de induzir apenas a produção de IL-6, IL-10 e TNF- α em níveis significativos, porém não houve produção significativa das citocinas IFN, IL-2, IL-4 e IL-17.

Gráfico 3: Ativação de T CD4⁺ e T CD8⁺ subconjuntos de linfócitos por pectina de folhas *C. tapia*. A contagem total de linfócitos mostrou que o subconjunto de linfócitos T CD8⁺ tem um valor superior em relação às células controle (p = 0,0468). As barras verticais representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata.



Os resultados da imunofenotipagem mostraram que a pectina induziu a ativação de uma resposta CD8⁺ significativa.

De acordo com LIM *et al.* (2003) a pectina (de maçã) aumentou a proporção de linfócitos T CD8⁺ in no MLN (linfonodo mesentérico). O estudo desenvolvido por Freire, *et al.* (2018)

mostraram o papel dos linfócitos CD8 + no processo inflamatório e na cicatrização, atuando em conjunto com os linfócitos Treg.

Vários estudos descrevem que as pectinas podem atuar no sistema imunológico, podendo modular as respostas imunológicas de acordo com as citocinas produzidas (SEYFRIED *et al.*, 2016; VARELLA *et al.*, 2001). Nos testes imunológicos, os resultados mostraram que a *C. tapia* pectina foi capaz de estimular uma resposta celular *in vitro*, produzindo em níveis significativos as citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α , caracterizando um efeito pró-inflamatório. perfil, no entanto, apresenta uma resolução pró-cura (RODRIGUES, 2017). Corroborando com nossos resultados, a pectina das folhas de *Plantago major* possui propriedades pró-cicatrizantes, além de ter um efeito mitogênico nos macrófagos (células envolvidas nos processos de cicatrização) e estimula a produção de TNF- α e IL-6 (SAMUELSEN, 1998; MICHAELSEN *et al.* 2000). De acordo com VARLJEN, *et al.* (1989), é relatado que a pectina das folhas de *Calendula officinalis* tem características curativas e promove a atividade fagocítica nos granulócitos. Além disso, as pectinas das mais diversas plantas têm sido utilizadas em formulações farmacológicas, como por exemplo, as membranas poliméricas (uma base de pectina) desenvolvidas por BASÍLIO (2018), que induzem a migração de fibroblastos para a área lesada, promovendo o reparo de o mesmo, o que leva a acreditar que as pectinas atuam na ativação dessas células.

6 CONCLUSÃO

A pectina extraída da *C. tapia* promove atividade antioxidante e imunomoduladora, estimulou predominantemente um perfil pró-inflamatório, porém possui resolução pró-cicatrizante em culturas de PBMCs humanas *in vitro*.

O estudo demonstrou que as pectinas possuem um potencial antioxidante, comparado com pectinas extraídas de outras espécies de plantas.

A citotoxicidade *in vitro* mostrou que a pectina, mesmo nas concentrações mais altas, não induziu morte celular significativa.

A pectina foi capaz de induzir a produção de IL-6, IL-10 e TNF- α em níveis significativos. O resultado da medida dos níveis de NO, bem como as citocinas IFN, IL-2, IL-4 e IL-17, não apresentaram resultados significativos. Além disso, os resultados da imunofenotipagem mostraram que a pectina induziu a ativação de uma resposta CD8 + significativa.

Os resultados podem ser preditivos para um futuro estudo utilizando as folhas pectinadas de *C. tapia* como um agente estimulador celular em formulações fitoterapêuticas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Novas investigações serão realizadas para verificar ou conferir sua potencialidade terapêutica inovadora, baseado nas informações de sua utilização de uso popular.

Nas próximas etapas iniciaremos os estudos “*in vivo*” e colocaremos os protocolos que serão definidos pela professora Dra. Maria Tereza dos Santos Correia.

REFERÊNCIAS

ADETUNJI, L. R. *et al.* Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. *Food Hydrocolloids*, 62, 2017. 239-250.*al*, 2015.Plants medicinais como alternativa terapêutica para aumento da resistência imunológica.

ALKORTA, I. *et al.* Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998. ISSN 0032.9592/9.

ALBAN, S. *et al.* Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. *Planta Medica*, v.12, p.1118-1124, 2002.

ANDRADE, T.C *et al*, 2021. Avaliação da atividade antioxidante e Imunomoduladora dos metabólitos Primários de *Pereska aculeata* Miller.

APGIII. **Angiospermphylogeny**. Availablin <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Access 6 mar. 2017.

APNE/CNIP. *Croton conduplicatus*. Disponível em: http://www.cnip.org.br/banco_img/Quebra%20Faca/crotonconduplicatus.html. Acesso em: 25 mar. 2019.

ARAÚJO, REGINA M.S, *et al.* Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. *Natural products and bioprospecting*, 2011, 1.2: 97-100.

ASUTI N, Wound healing property of alcoholic extract of root bark of *Crataeva nurvula*, *Journal of Pharmacy Research*, 2010; 3(5): 1121-1123

ATMODJO, M.A. *et al.* Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, v.64, p.747-749, 2013

BANI S, KAUL A, AHMAD SF, SURI KA, GUPTA BD, SATTI N.K. Qazi GN, Suppression of T lymphocyte activity by lupeol isolated from *Crataeva religiosa*, *Phytotherapy Research*, 2006; 20(4): 279-87.

BARAPATRE, ANAND, *et al.* "In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*." *International journal of biological macromolecules* 86 (2016): 443-453.

BARLOW, S. M. Toxicological aspects of antioxidants uses as food additives. In: Hudson, B.J.F. Food Antioxidants, v. 6, p. 253-307, 1990.

BARREIRO E, BOLZANI V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova* 2019; 32(3): 679-688.

BASÍLIO, JACQUELINE ARANTES DINIZ. "Desenvolvimento e avaliação in vitro da atividade cicatrizante de membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha." (2018).

BEG, S. *et al.* Systematic review of herbals as potential antiinflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. *Pharmacognosy Review*, v. 5, n. 10, p.120-137, 2011.

BHASKAR V.H, PROFULLA KM, BALAKRISHNAN B.R, BALAKRISHNAN N, SANGAMESWARAM B. Evaluation of the anti-fertility activity of stem bark of *Crataeva nurvulabuch-hum*, *African Journal of Biotechnology*, 2009; 8 (22): 6453-6456

BOPANA N, SAXENA S, *Crataeva nurvula*: A valuable medicinal plant, *Journal of Herb Spices & Medicinal Plants*, 2008; 14(1-2): 107-127.

BORTOLUZZI, M.M, 2019. Effect of herbal medical plants on anxiety: a brief review.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira: Volume 1. 5 ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, DF (Brazil), 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeias-virtuais>>. Acesso em: 23 de setembro de 2018.

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

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

CANTERI M.H.G, MORENO L, WOSIACKI G, SCHEER A.P. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. *Polímeros*. 2012, 22(2): 149-157. ISSN 0104-1428.

CARNEIRO, F. M. *et al.* Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais*. v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014

CASTRO, M. R. *et al.* Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares, o uso de Plantas Medicinais no SUS, 2019.

CAVALCANTE S. C. **Ecosistema de várzea: etnobotânica e ecofisiologia**. Dissertation (Masters in Natural Resources of Amazonia) Universidade Federal do Oeste do Pará, Pará. 2014.

CHEMAT, F. *et al.* Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 2017. 540-560.

CHOI, C. W. *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant science*, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.

CINTRA, A.J.L, 2017. Avaliação da Toxicidade da Lectina da *Crataeva tapia* (CrataBL) livre e encapsulada.

CORDEIRO, M.F, 2017. Avaliação das atividades Imunomoduladora, antineoplásicae antibacteriana de Rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas e caule de *Trichilia catiguá*.

CORNEJO, X.; ILTIS, H. H. A revision of the american species of the genus *Cratava* (Capparaceae). Harvard, **Papers in Botany**, v. 13, n. 1, p. 121-135, 2008.

COSTA, M. P. M.; FERREIRA, I. L. M.; CRUZ, M. T. M. New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay. *Carbohydrate Polymers*, v. 146, n. 1, p. 123-130, 2016

CRUZ FILHO, IRANILDO JOSÉ, *et al.* "Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production." *International journal of biological macromolecules* 123 (2019): 1331-1339.

CRUZ, VANESSA DE SOUSA. Avaliação das propriedades antiproliferativas da β lapachona em cultura de células de osteossarcoma canino. **Tese**. Doutorado em Ciência Animal. Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. 2015.

DAI, JIN; MUMPER, RUSSELL J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DE ARAÚJO, REGINA MARIA SOUSA, *et al.* *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. *Plant science*, 183: 20-26, 2012.

DE MELO, C. M. L., MELO, H., CORREIA, M. T., COELHO, L. C. B. B., DA SILVA, M. B., & PEREIRA, V. R. A. (2011). Mitogenic response and cytokine production induced by CRAMOLL 1, 4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scandinavian journal of immunology*, 73(2), 112-121

DIALLO, D. *et al.* Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.159-171, 2001.

DOSSIÊ DOS ANTIOXIDANTES, food Ingredients Brasil,2009.

ELLIS, M. *et al.* Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiology*, v.153, p.403-419, 2010

ENCALADA, ALONDRA M. IDROVO, *et al.* "Antioxidant pectin enriched fractions obtained from discarded carrots (*Daucus carota* L.) by ultrasound-enzyme assisted extraction." *Food chemistry* 289 (2019): 453-460.

ESPITIA, P. J. P.; DU, W.; AVENA-BUSTILLOS, R. de J.; SOARES, N. de F. F.; MCHUGH, T. H. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, vol. 35, p. 287-296, Minas Gerais, Brazil, 2014.

FENALTI, J. M. *et al.* Diversidade das plantas brasileiras com potencial antihelmíntico. *VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde*, v. 28, n. 1, p. 38-49, 2016. 3

FERNANDES, R. V. B. *et al.* Otimização do processo de extração e caracterização química de pectina de cenoura. *Magistra, Cruz das Almas – BA*, v. 26, n. 2, p. 114-122, 2014.

FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/03/21/a-maior-diversidade-de-plantas-do-mundo/>. Acesso em: 10 jan. 2019.

- FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá, PA. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.7, n.4, p.757-768, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14_064
- FORD, J.B.; SUTTER, M.E.; OWEN, K.; ALBERTSON, T.E. Volatile Substance Misuse: An Updated Review of Toxicity and Treatment. *Clin. Reviews in Allergy & Immunology*, v. 46, p. 19-33, 2014.
- FORZZA, R. C. Introdução. in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Available in <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>>.
- FRACASSO, A.F. Modificação química de Pectina Cítrica : Implicações estruturais, físicas e reológicas, 2015.
- FREIRE, LETÍCIA CASTRO, *et al.* "A relação dos Linfócitos T reguladores na cicatrização: revisão da literatura." *COORTE-Revista Científica do Hospital Santa Rosa* 08 (2018).
- GADELHA, C.S. Estudos Bibliográfico sobre o uso das Plantas Mediciniais e Fitoterápicos no Brasil, 2013.
- GUIMARÃES, I.C.S.B. Quantificação de lignina em *Bachiaria spp.* Medida por LDA, LBA e NRIS, 2019.
- GUO, X.; MENG, H.; ZHU, S.; TANG, Q.; PAN, R.; YU, S. Developing precipitation modes for preventing the calcium-oxalate contamination of sugar beet pectins. *Food Chemistry*, vol. 182, p. 64-71, Guangzhou, China, 2015
- HAMEDT *et al.* Avaliação Citotóxica, Mutagênica e Genotóxica de Extratos Brutos de Piper jericóense com ação tripanocida, 2014.
- HARHOLT, JESPER; SUTTANGKAKUL, ANONGPAT; SCHELLER, HENRIK VIBE. Biosynthesis of pectin. *Plant physiology*, 2010, 153.2: 384-395.
- HERMÊNIO CAVALCANTE LIMA, Facts and myths about immunomodulators, 2019
- HIRA, INDU, *et al.* "Pectin-guar gum-zinc oxide nanocomposite enhances human lymphocytes cytotoxicity towards lung and breast carcinomas." *Materials Science and Engineering: C* 90 (2018): 494-503.

HISAM, ELLY EZLINDA ABDUL *et al.* Combined extract of *Moringa oleifera* and *Centella asiatica* modulates oxidative stress and senescence in hydrogen peroxide-induced human dermal fibroblasts. *Turkish Journal of Biology*, v. 42, n. 1, p. 33-44, 2018.

HOSSEINI, S. S., KHODAIYAN, F., KAZEMI, M., NAJARI, Z. Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 125, p. 621-629, Karaj, Iran, 2019.

HUR S.J, KIM Y.C, CHOI I, LEE S.K. The effects of biopolymer encapsulation on total lipids and cholesterol in egg yolk during in vitro human digestion. *Inter J Mol Sci.* 2013; 14(8): 16333-16347.

INAYATHULLA S, KARIGAR W.R, ASIF A, SIKARWAR M.S, Evaluation of anti-diarrhoeal activity of *Crataeva nurvula* root bark in experimental animals, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*,2010; 2(1): 158-161.

JAMES, JACINDA; DUBERY, IAN. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, v. 14, n. 10, p. 3922-3941, 2009.

KAYA, M *et al.* Caracterização de amostras de Pectinas cítricas extraídas em diferentes condições: Influência do tipo de ácido e do pH de Extração, 2014.

KAMATH R, SHETTY D, BHAT P, SHABARAYA A.R, HEGDE K, Evaluation of antibacterial and anti helminthic activity of root extract of *Crataeva nurvula*, *Pharmacology online*, 2011; 1: 617-622. Agarwal S, Gupta S, Saxena AK, Gupta N, Agarwal S, Urolithic property of *Varuna* (*Crataeva nurvula*): An experiment, *Ayu*,2010; 31(3): 361-366

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

KIM, M. J.; JU, H.K.; KIM, Y.; YOO, S.; KIM, Y. Effects of amidation and/or methylesterification of pectin on aroma release at different calcium concentration. *Food Hydrocolloids*, vol. 52, p. 343-349, Seoul, Republic of Korea, 2016.

KOSSI, M. *et al.*, 2020. Antihyperglycaemic and antioxidante activities of *Crataeva adansonii* D.C. app. *Adansonii* leaves extract ou ICR mice.

- KUMARI A, KAKKAR P. Screening of Antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays, *Biomedical and Environmental Science*; 2008; 21: 4-29
- LECLERE, LIONEL, *et al.* "Identification of a cytotoxic molecule in heat-modified citrus pectin." *Carbohydrate polymers* 137 (2016): 39-51.
- LEE, S. K. *et al.* Evaluation of antioxidant potential of natural products. *Comb Chem High Throughput Screen*, v. 1, n. 1, p. 35-46, 1998.
- LEFSIH, KHALEF, *et al.* "Biochemical and biophysical characterization of water-soluble pectin from *Opuntia ficus-indica* and its potential cytotoxic activity." *Phytochemistry* 154 (2018): 47-55.
- LEMNIS (2016). "LEMNIS Farmácia". [Online]. Disponível: <http://www.lemnismfarmacia.com.br/passiflora-maracuja-%E2%80%93-no-tratamento-dainsonia-ansiedade-irritabilidade-e-insonia/>. Acesso em 08 Junho 2016.
- LI, ROBERT; JIA, ZHENQUAN; TRUSH, MICHAEL A. Defining ROS in biology and medicine. *Reactive oxygen species* (Apex, NC), v. 1, n. 1, p. 9, 2016.
- LIM, BEONG OU, *et al.* "Effect of dietary pectin on the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67.8 (2003): 1706-1712.
- LIMA, B. G. de. **Caatinga espécies lenhosas e herbáceas**. 1ª. ed. Mossoró: EDUFERSA editora universitária, 2012. v. 3000. 316p .
- LIMA, V.J. Espectrômetro de ressonância Magnética Nuclear Super- Heteródino de banda larga, 2008.
- LIMA, H.C., 2007. Facts and myths about imunomodulators.
- LIMA, O.C *et al*, 2020. Evaluation fthe Citotoxicity of the essential oil of *enmanthus erythropappus* on breast- câncer cell MCF-7.
- LIMA, R.T.M, Extração da Pectina do Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) para incorporação em Biofilmes, 2019.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa. Plantarum. 5 ed. 384 p. 2008.

LUCENA, REINALDO F.P, *et al.* Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil—a look at their conservation and sustainable use. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2007, 125.1-3: 281-290.

MACHADO, J. R. A.; SILVA, N. G.; DUARTE, C. C. Biodiversidade florística ameaçada pelo uso intensivo de pastagens, no município de Palmeirina – PE. **REGNE**, vol. 2, n. Especial, 2016.

MALAN R, WALIA A, GUPTA S. New frontiers on Nephrolithiasis: Pathophysiology and management of kidney stones, *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2011; 2(3): 775- 786

MANAYI, A.; VAZIRIAN, M.; SAEIDNIA, S. Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Farmacognosy reviews*, v. 9, n. 17, p. 63-72, 2015.

MARENDA, F, R. Citotoxicidade de Pectinas de Albedo de Maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*) em linhagens tumorais, 2015.

MARQUES, G. S *et al*, Plantas medicinais como alternativa terapêutica para aumento da resistência imunológica, 2015.

MARTINEZ, A.C *et al*, 1999. O sistema Imunológico (II): Importância dos imunomoduladores na recuperação dos desportistas.

MARTELLI, A. *et al*, 2019. Percepção dos Moradores do Distrito de Eleutério, município de Itapira-SP, acerca da utilização de Plantas Medicinais, 2019.

MELLINGER, C.G. *et al.* Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, p. 115-120, 2008.

MICHAELSEN, T.E. *et al.* Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.52, p.483-490, 2000.

- MICHAELSEN, T.E. *et al.* Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.52, p.483-490, 2000.
- MIRANDA, B. M., 2019.Extração de Bioativos de casca de Jaboticaba: Pectina e Antocianinas.
- MOHNEN, DEBRA. Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 2008, 11.3: 266-277.
- MOREIRA, PAULO CESAR, *et al.* "Pectina: um carboidrato complexo e suas aplicações." *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde* 35.3 (2008): 343-355.
- MORENO, L *et al.* Pectina: da Matéria ao produto final, 2012
- MORO, M. F. *et al.* Vegetação, unidades fitoecológicas e diversidade paisagística do estado do Ceará. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 3, p. 717-743. 2015.
- MUKHERJEE, P. K.; NEMA, N. K.; BHADRA, S.; MUKHERJEE, D.; BRAGA, F. C.; MATSABISA, M. G. Immunomodulatory leads from medicinal plants. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, v. 13, n. 2, p. 235-256, 2014.
- NETEA, M. G.; VAN DE VEERDONK, F. L.; VAN DER MEER, J. W.; DINARELLO, C. A.; JOOSTEN, L. A. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annual review of immunology*, v. 33, p. 49-77, 2015.
- NETO, R. L. S.; JARDIM, J. G. Capparaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 3, p. 847-857, 2015.
- NETO, R.L.S, *et al.* Flora do Ceará, Brasil: Capparaceae Flora of Ceará state, Brazil: Capparaceae,, 2014.
- NEVES, R. B. **Caracterização das reservas das sementes e avaliação da germinação e formação de plântulas de nove espécies arbóreas de florestas alagáveis da Amazônia.** Dissertation (Masters in Botany). Universidade de Brasília, DF. 2013.
- NUZZO, DOMENICO, *et al.* "Exceptional Antioxidant, Non-Cytotoxic Activity of Integral Lemon Pectin from Hydrodynamic Cavitation." (2020).

OCHOA-VILARREAL, M. *et al.* Plant cell wall polymers: Function, structure and biological activity of their derivatives. In: GOMES, A.S. Polymerization. [S.l.]. InTech, 2012. p.63-83

OGUTU, FREDRICK ONYANGO, AND TAI-HUA MU. "Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity." *Ultrasonics sonochemistry* 38 (2017): 726-734.

OLIVEIRA G.L.S, 2015. Determination *in vitro* of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH•method: review study

OLIVEIRA, FERNANDA DA SILVA, 2012. Ajuste de Metodologia de Extração de Substâncias Pécnicas para Extração de Pectina de Casca de Umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.)

OLIVEIRA, G.L.S, 2015. Determination *in vitro* of the Antioxidant capacity of natural products by the DPPH- Method review study.

OLIVEIRA, JAINE, 2019. Extração e Caracterização da Pectina da Farinha do Mesocarpo do Babaçu.

OLIVEIRA, M.P, 2009. Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferaçãocelular em equivalentes de Pele Humana.

OTHMAN, LEEN; SLEIMAN, AHMAD; ABDEL-MASSIH, ROULA M. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 911, 2019.

PAIVA, E.P. Pectina; Propriedades Químicas e Importância sobre a estrutura da Parede Celular de frutos durante o processo de maturação, 2009.

PATIL U.H, DATTATRAYA K.G, Differential bactericidal potential and phytochemical evaluation of *Crataeva religiosastem* bark, *International Journal of Pharma. Research & Development*, 2012; 2 (11): 82-88

PAULSEN, B.S.; BARSETT, H. Bioactive pectic polysaccharides. *Advances in Polymer Science*, Berlin;Heidelberg: Springer, v.186, p.69-101, 2005

- PÉREZ, S.; MAZEAU, K. Conformations, structures, and morphologies of celluloses. In: DEKKER, M. Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility. 2nd ed. [S.l.]. Severian Dumitriu, 2005. p.41-68
- PIEADADE J, CANNIATTI-BRAZACA S.G. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e da pectina cítrica de alta metoxilação no nível de colesterol sanguíneo em ratos. Ciên Tecnol Alim. 2003; 23 (2):149-156.
- PINHEIRO, D.C *et al*, 2016. Immunomodulatory activity of the medicinal plants: Perspectives for veterinary medicine.
- RAMOS, J.M.R, 2019. Avaliação da atividade antioxidante de plantas medicinais Africanas.
- RIBEIRO, A.C.B. Isolamento e caracterização do Pectina do caju (*Anacardium occidentale* L.) Para aplicação na liberação controlada de Mangiferina.
- ROCHEL, T.C. Determinação e Avaliação da Atividade Antioxidante em Polpas de Frutas de Açaí, Acerola e Cupuaçu, 2015.
- SAHOO S, MISHRA S.K, PANDA P.K, TRIPATHY S, MISHRA S.R, ELLAIAH P, DASH S.K. Antimycotic potential of *Crateva religiosa* Hook and Forst against some selected fungal pathogens, *Acta Polonica Pharmaceutica*, 2008; 65(2): 245-247
- SALEHI, BAHARE *et al*. Antioxidants: Positive or negative actors?. *Biomolecules*, v. 8, n. 4, p. 124, 2018.
- SAMUELSEN, A.B. *et al*. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers*, London, v.35, p.145-153, 1998.
- SANDARANI, M. D. J. C. A Review: Different Extraction Techniques of Pectin. *Journal of Pharmacognosy & Natural Products*, 3, 27 novembro 2017. 1-5.
- SANTOS, E. K. R. Avaliação da capacidade de extração de pectina da casca do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) em mesa agitadora e ultrassom associada à ação de ácido cítrico. Trabalho de Conclusão de Curso UFPE, Recife, 2015.

SANTOS, E.E, 2020. Utilização de Farinha de Casca de Passiflora sp.(maracujá)como biossíntese para Cr (II), Cd (II), Pb (II) e filtro funcionalizado com pectina para Hg atmosférico.

SCHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. Annual Review of Plant Biology, v.61, p.263- 289, 2010

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

SEIFERT, G.J.; ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. Annual Review of Plant Biology, v.58, p.137-161, 2007

SEYFRIED, M. *et al.* Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 18, n. 1, p. 201- 214, 2016.

SEYFRIED, M., SOLDERA-SILVA, A., BOVO, F., STEVAN-HANCKE, F.R., MAURER, J.B.B., ZAWADZKI-BAGGIO, S.F. “Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras”. Rev. Bras. Plantas Med., 18:201, 2016.

SHARMA, ALIWAL, M.K.; PATIL, A. Antibacterial activity of leaf and bark extracts of *Crataeva tapia* L. International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS), v.3, n.4, p.41-52, 2014

SHARMA, P.; PATIL, D.; PATIL, A. *Crataeva tapia* linn. - an important medicinal plant: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. v. 4, p. 582 -589, 2013.

SHARMA, P.; PATIL, D.; PATIL, A. *Crataeva tapia* linn. - an important medicinal plant: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. v. 4, p. 582 -589, 2013

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

SIKARWAR M.S, PATIL M.B, Antidiabetic activity of *Crataeva nurvula* stem bark extracts in alloxan induced diabetic rats, *Journal of Pharmacy & Bio Allied Sciences*, 2010;2(1): 18-21.

SILVA, O.A. ANTIOXIDANT POWER OF CAROTENOIDS, FLAVONOIDS AND VITAMIN E IN PREVENTING ARTERIOSCLEROSIS, 2014.

SILVA, E.L.G.S *et al*, 2019. Estudo Fitoquímico, atividade antioxidante e tóxica da casca da *Anadenanthera colubina*(vell).

SILVA, S.C. 2015. Caracterização Farmacologia Pré-clínica da atividade antiinflamatória de novos derivados N- Acilhidrazônicos.

SILVA, J.C.S *et al*. Análises Quali-Quantitativas da forragem nativa trapiá (*crataeva tapia* l.) na Caatinga de Alagoas, 2020.

SOUZA *et al*, 2020. Evaluation of Antioxidant activities in plants of the genus *Croton*.

SOUZA, L.I.O, 2017. Avaliação *in vitro* do potencial Tripanocida, citotóxico e Imunomodulador de óleos essenciais de plantas da Caatinga.

SOUSA, LUCAS DELANO NASCIMENTO. Importância do Trapiá (*Crataeva tapia*) como fonte de alimento para abelhas africanizadas e nativas, 2019.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of Pectin and its Pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn Univ Inter J Bangkok*. 2003; 3: 206–228.

STOUDT, HARRY N. The floral morphology of some of the Capparidaceae. *American Journal of Botany*, 1941, 664-675.

TRIPATHY S, ASHA M, PRADHAN D, Acute and Chronic anti-inflammatory evaluation of *Crataeva religiosa* in rats, *International Journal of Pharmacy & Technology*;2010;2(4): 1270-1279

VARGAS, E. C. A.; TEIXEIRA, E. R.; WERNECK, Y. C. S.; ARANTES, D. G. The therapeutic use of plants by users of a public prehospital unit in Campos dos Goytacazes City, Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista Online Pesquisa Cuidado é Fundamental*, v. 11, n. 5, 1129–1134, 2019.

VARGAS, O.J. Estudo Computacional sobre a estrutura tridimensional da Pectina, 2014.

- VARLJEN, JADRANKA, ANDRAS LIPTÁK, AND HILDEBERT WAGNER. "Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*." *Phytochemistry* 28.9 (1989): 2379-2383.
- VASCONCELOS, J. C.B, 2019. Avaliação do Rendimento da Extração de Pectina da Farinha da Casca de Banana Verde tipo Cavendish (musa aaa) utilizando um Planejamento Fatorial
- VELOSO, P.H.H.J. Avaliação da Atividade Imunomoduladora e/ou antifúngica dos Peptídeos ToAP3 e ToAP4 obtidos de escorpião e dos Peptídeos Polybra-MPH e Agelaia-MPI obtidos de vespa, 2019.
- VERONOVSKI, A.; TKALEC, G.; KNEZ, Z.; NOVAK, Z. Characterisation of biodegradable pectin aerogels and their potential use as drug carriers. *Carbohydrate Polymers*, vol. 113, p. 272-278, Maribor, Slovenia, 2014.
- VIEIRA, N.A *et al*, 2014. Anti-inflammatory effect of ginger and possible signaling pathway.
- ZHANG, F. *et al*. Structural Studies of the Interaction of *Crataeva tapia* Bark Protein with Heparin and Other Glycosaminoglycans. *Biochemistry*, v.52, p.2148–2156, 2013
- WANDERLEY, L. S. M.; SILVA, L. V. L. A.; CEZAR, L. M.; DIAS, F. O. C.; GALDINO, P. K. S.; ARAÚJO, I. M. Uso de plantas medicinais por indivíduos da comunidade do Valentina-PB. *Rev. Ciêc. Saúde Nova Esperança*, v.13, n.2, p.99-105, 2015. DOI: <https://doi.org/10.17695/revcsnevo113n2p99%20-%2015>
- WANG, W. *et al*. Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. *Journal Of Food Engineering*, [s.l.], v. 234, p. 98-107, out. 2018. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.016>.
- YADANG, FANTA *et al*. Quantification of Bioactive Compounds and Evaluation of the Antioxidant Activity of *Carissa edulis* Valh (Apocynaceae) Leaves. *The Scientific World Journal*, v. 2019, 2019.
- YAMASSAKI, F.T. *et al*. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. *Carbohydrate Polymers*, v.125, p.241- 248, 2015

YAMAMOTO, E. L. M. et al. Função do cálcio na degradação da parede celular vegetal de frutos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró - RN, p. 49-55, 2011. ISSN 1981-8203.

YUAN H, MA Q, YE L, PIAO G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* 2016; 21(559): 1-18.

ZHANG, F. *et al.* Structural Studies of the Interaction of *Crataeva tapia* Bark Protein with Heparin and Other Glycosaminoglycans. *Biochemistry*, v.52, p.2148–2156, 2013

ZHANG, F. et al. Structural Studies of the Interaction of *Crataeva tapia* Bark Protein with Heparin and Other Glycosaminoglycans. *Biochemistry*, v.52, p.2148–2156, 2013

ZHANG, X. *et al.* Exosomes in cancer: small particle, big player. *Journal of hematology & oncology*, v. 8, n. 1, p. 83, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO

NATURAL PRODUCT RESEARCH
 FATOR DE IMPACTO: 1.999 (2018)
 BIOTECNOLOGIA: A4 (2020)
 ISSN: 1478-6427

Pectin isolated from the leaves of *Crataeva tapia* promotes antioxidant and immunostimulant activity

Simone da Paz Leôncio Alves¹, Marcela Daniela Muniz Arruda¹, Georon Ferreira de Sousa², Guilherme Antonio de Souza Silva², Iranildo José da Cruz-Filho², Diego Santa Clara Marques², Dayane Kelly Dias do Nascimento Santos², Cristiane Moutinho Lagos de Melo², Ivone Antonia de Souza¹.

¹Department of Histology and Embriology, Biological Sciences Centre, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil. ²Department of Antibiotics, Biosciences Centre, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

Objective: This study aims to analyze pectin isolated from *C. tapia* leaves regarding its antioxidant, cytotoxic and immunomodulator profile. **Methodology:** The pectin extraction method was carried out by different organic agents. After obtaining the pectin, the antioxidant activity was determined by the ability of the antioxidants present in the samples to eliminate free radicals and determined through the DPPH assays, sequestering of peroxide radicals, ABTS, AAT, AQ, AR and NO. In addition, cytotoxic, immunomodulatory and immunophenotyping assays were performed (flow cytometry analysis). **Results:** The Pectin showed moderate antioxidant capacity for ABTS, DPPH and TAA assays, 41.16 ± 0.30 , 25.9 ± 0.01 and 25.9 ± 0.01 % 0.5mg respectively. In addition, the pectin did not affect splenocytes viability at 10 $\mu\text{g/mL}$ and promoted the production of IL-6, IL-10, and TNF- α cytokines, and induced the activation of a significant CD8⁺ response. **Conclusion:** The pectin of *C. tapia* showed antioxidant activity and were able to induce immunostimulatory action in human PBMCs cultures *in vitro*.

Keywords: Pro-inflammatory profile, Cytotoxic T lymphocyte (CD8⁺), Healing.

1. INTRODUCTION

Plants are important banks of natural resources and directly exert great influence on contemporary society. In particular, because alternative methods of treatment of various human pathologies can be used (Yuan et al., 2016). Therefore, a varied source of biologically active natural products, many of which are models for the synthesis of a large number of drugs. Despite the increase in studies in this area, the available data reveal that only 15 to 17% of the plants were studied for their medicinal potential (Barreiro et al., 2019).

The plant cell wall consists of structural polysaccharides such as hemicellulose, lignin and pectin. These three types are represented on almost all vegetable cell walls in varying proportions, giving greater or lesser stiffness depending on its location in the plant body (Mohnen et al., 2008). The chemical components that correspond to most of the pectin material are α -D-galacturonic acid linked to 1'4 esterified with methanol. Pectins are the matrix in which cellulose microfibrils are incorporated. Interactions between different polysaccharides ensure the strong but dynamic and flexible properties of the cell wall (Harholt et al., 2010).

In the Capparaceae family there are approximately 46 genus and 650 species, spread in the tropical and subtropical regions of all over the world. Among the species, *Crataeva tapta* stands out, popularly known as "trapiá" or "cabaceim" (Stoudt, 1941). It's a kind of tree, being the only member of the monotypic genus, native to the Americas. It's a common species in dry forests and areas with sandy soils, especially between Mexico and the Amazon. In several studies conducted with leaves of *C. tapta*, revealed activities against guinea worm and malaria, being also a relevant anti-inflammatory (Lucena et al., 2007).

An important macromolecule isolated from *C. tapta* is lectin CrataBL (lectin isolated from the bark of *C. tapta*) with various activities, among them, stand out: antitumor; antimicrobial; and insecticide (De Araújo et al., 2011 and 2012). However, there is no other macromolecule isolated from any other organs of the plant. Thinking, this study aims to analyze pectin isolated from *C. tapta* leaves regarding its antioxidant, cytotoxic and immunomodulator profile. As well, the presentation of its physicochemical characterization.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Antioxidant activities *in vitro*

The antioxidant activity was determined by the ability of the antioxidants present in the samples to eliminate free radicals and determined through the DPPH assays, sequestering of peroxide radicals, ABTS, AAT, AQ, AR and NO. The tests did not show E50 (Concentration where 50% of the radical is captured). The Pectin showed moderate antioxidant capacity for ABTS, DPPH and TAA assays, 41.16 ± 0.30 , 25.9 ± 0.01 and 25.9 ± 0.01 % 0.5mg respectively (Table S1). Several studies show that pectins are widely described for their antioxidant potential (Nuzzo, et al. 2020; Moreira, et al. 208). Similar to our results, the pectins isolated from the raisins of *Daucus carota* and *Ipomoea potatoes* are reported in the literature for presenting antioxidant capacity (Encalada, et al. 2019; Ogutu and Tai-Hua, 2017).

2.2. Cytotoxicity

In vitro cytotoxicity showed that pectin, even at the highest concentrations, did not induce significant cell death. The cytotoxicity results, expressed as % of alive cells, showed that more than 85% of human PBMCs remained alive after treatment can be seen in Figure S1. Based in this result, we choice used the 10 µg/mL concentration for immunostimulant tests. Studies available in the literature Show that as isolated pectins they do not have a toxicity profile against animal cells (Costa, et al. 2016), corroborating our results from the studies reported by Lefsih, et al. (2018) and Lionel, et al. (2016) they showed that the pectin *Opuntia ficus-indica* and the Citrus pectin does not present a cytotoxicity profile in normal animal cell culture.

2.3. Cytokines, nitrite production and immunophenotyping

Production of cytokines were determined to investigate the immunostimulatory effects promoted by pectin (10 µg/mL) in cell cultures. Among the dosed cytokines, pectin was able to induce only the production of IL-6, IL-10 and TNF-α at significant levels (figure S2). The result of the measurement of NO levels, as well as the cytokines IFN, IL-2 IL-4 and IL-17, did not show significant results. In addition, the immunophenotyping results showed that pectin induced the activation of a significant CD8 + response (figure S3).

According to Lim, et al. (2003) pectin (from apple) increased the proportion of CD8⁺ T lymphocytes in MLN (mesenteric lymph node). The study developed by Freire, et al. (2018) showed the role of CD8⁺ lymphocytes in the inflammatory process and healing, acting in conjunction with Treg lymphocytes.

Several studies describe that pectins can act on the immune system, being able to modulate immune responses according to the cytokines produced (Seyfried et al., 2016; Varella et al, 2001). In the immunological tests, the results of this showed that the *C. taptia* pectin was able to stimulate a cellular response in vitro, producing at significant levels the cytokines IL-6, IL-10, and TNF- α , characterizing a pro-inflammatory profile, however, present a pro-healing resolution (Rodrigues, 2017). Corroborating with our results, the pectin of the leaves of *Plantago major* has pro-healing properties, as well as having a mitogenic effect on macrophages (cells involved in the healing processes) and stimulates the production of TNF- α and IL-6 (Samuelsen, et al. 1998; Michaelsen, et al. 2000). According to Varljen, et al. (1989), the pectin from the leaves of *Calendula officinalis* is reported to have healing characteristics and promotes phagocytic activity in granulocytes. In addition, the pectins of the most diverse plants have been used in pharmacological formulations, as an example, the polymeric membranes (a pectin base) developed by Basilio (2018), which induced the migration of fibroblasts to the injured area, promoting repair of the same, which leads to believe that pectins act in the activation of these cells.

3. EXPERIMENTAL

Includes experimental section.

4. CONCLUSION

The *C. taptia* pectin promotes antioxidant and immunomodulatory activity, predominantly stimulating a pro-inflammatory profile, however it has a pro-healing resolution in human PBMCs cultures *in vitro*. The results can be predictive for the future study using the pectinated leaves of *C. taptia* as a cellular stimulating agent in phytotherapeutic formulations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Nucleus of Technological Platforms (NPT-1) located at Aggeu Magalhães Institute (IAM) for the access to the flow cytometer.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

ARAÚJO, Regina MS, et al. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. *Natural products and bioprospecting*, 2011, 1.2: 97-100.

Barreiro E, Bolzani V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova* 2019; 32(3): 679-688.

Basílio, Jacqueline Arantes Diniz. "Desenvolvimento e avaliação in vitro da atividade cicatrizante de membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha." (2018).

Costa, M. P. M.; Ferreira, I. L. M.; Cruz, M. T. M. New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay. *Carbohydrate Polymers*, v. 146, n. 1, p. 123-130, 2016

DE Araújo, Regina Maria Sousa, et al. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. *Plant science*, 183: 20-26, 2012.

Encalada, Alondra M. Idrovo, et al. "Antioxidant pectin enriched fractions obtained from discarded carrots (*Daucus carota* L.) by ultrasound-enzyme assisted extraction." *Food chemistry* 289 (2019): 453-460.

Fernandes, R. V. B. et al. Otimização do processo de extração e caracterização química de pectina de cenoura. *Magistra*, Cruz das Almas – BA, v. 26, n. 2, p. 114-122, 2014.

Freire, Leticia Castro, et al. "A relação dos Linfócitos T reguladores na cicatrização: revisão da literatura." *COORTE-Revista Científica do Hospital Santa Rosa* 08 (2018).

Harholt, Jesper; Suttangkakul, Anongpat; SCHELLER, Henrik Vibe. Biosynthesis of pectin. *Plant physiology*, 2010, 153.2: 384-395.

Hira, Indu, et al. "Pectin-guar gum-zinc oxide nanocomposite enhances human lymphocytes cytotoxicity towards lung and breast carcinomas." *Materials Science and Engineering: C* 90 (2018): 494-503.

Hira, Indu, et al. "Pectin-guar gum-zinc oxide nanocomposite enhances human lymphocytes cytotoxicity towards lung and breast carcinomas." *Materials Science and Engineering: C* 90 (2018): 494-503.

Leclere, Lionel, et al. "Identification of a cytotoxic molecule in heat-modified citrus pectin." *Carbohydrate polymers* 137 (2016): 39-51.

Lefsih, Khalef, et al. "Biochemical and biophysical characterization of water-soluble pectin from *Opuntia ficus-indica* and its potential cytotoxic activity." *Phytochemistry* 154 (2018): 47-55.

Lim, Beong Ou, et al. "Effect of dietary pectin on the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67.8 (2003): 1706-1712.

- Lucena, Reinaldo FP, et al. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil—a look at their conservation and sustainable use. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2007, 125.1-3: 281-290.
- Michaelsen, T.E. et al. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.52, p.483-490, 2000.
- Mohnen, Debra. Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 2008, 11.3: 266-277.
- Moreira, Paulo Cesar, et al. "Pectina: um carboidrato complexo e suas aplicações." *Revista EFS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde* 35.3 (2008): 343-355.
- Nuzzo, Domenico, et al. "Exceptional Antioxidant, Non-Cytotoxic Activity of Integral Lemon Pectin from Hydrodynamic Cavitation." (2020).
- Ogutu, Fredrick Oryango, and Tai-Hua Mu. "Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity." *Ultrasonics sonochemistry* 38 (2017): 726-734.
- Samuelsen, A.B. et al. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers*, London, v.35, p.145-153, 1998.
- Seyfried, M. et al. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 18, n. 1, p. 201- 214, 2016.
- Stoudt, Harry N. The floral morphology of some of the Capparidaceae. *American Journal of Botany*, 1941, 664-675.
- Varljen, Jadranka, Andras Lipták, and Hildebert Wagner. "Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*." *Phytochemistry* 28.9 (1989): 2379-2383.
- Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* 2016; 21(539): 1-18.

APÊNDICE B – METODOLOGIA DO ARTIGO SUBMETIDO

NATURAL PRODUCT RESEARCH
 FATOR DE IMPACTO: 1.999 (2018)
 BIOTECNOLOGIA: A4 (2020)
 ISSN: 1478-6427

Pectin isolated from the leaves of *Crataeva tapia* promotes antioxidant and immunostimulant activity

Simone da Paz Leôncio Alves¹, Marcela Daniela Muniz Arruda¹, Georon Ferreira de Sousa², Guilherme Antonio de Souza Silva², Iranildo José da Cruz-Filho², Diego Santa Clara Marques², Dayane Kelly Dias do Nascimento Santos², Cristiane Moutinho Lagos de Melo², Ivone Antonia de Souza¹.

¹Department of Histology and Embriology, Biological Sciences Centre, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil. ²Department of Antibiotics, Biosciences Centre, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

Objective: This study aims to analyze pectin isolated from *C. tapia* leaves regarding its antioxidant, cytotoxic and immunomodulator profile. **Methodology:** The pectin extraction method was carried out by different organic agents. After obtaining the pectin, the antioxidant activity was determined by the ability of the antioxidants present in the samples to eliminate free radicals and determined through the DPPH assays, sequestering of peroxide radicals, ABTS, AAT, AQ, AR and NO. In addition, cytotoxic, immunomodulatory and immunophenotyping assays were performed (flow cytometry analysis). **Results:** The Pectin showed moderate antioxidant capacity for ABTS, DPPH and TAA assays, 41.16 ± 0.30 , 25.9 ± 0.01 and 25.9 ± 0.01 % 0.5mg respectively. In addition, the pectin did not affect splenocytes viability at 10 µg/mL and promoted the production of IL-6, IL-10, and TNF-α cytokines, and induced the activation of a significant CD8⁺ response. **Conclusion:** The pectin of *C. tapia* showed antioxidant activity and were able to induce immunostimulatory action in human PBMCs cultures *in vitro*.

Keywords: Pro-inflammatory profile, Cytotoxic T lymphocyte (CD8⁺), Healing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Collection of plant material

Crataeva tapia leaves in adult stage were collected in Janeiro 2020 in the location of Cidade Universitária, Recife, Brazil (8° 2' 50.312'' S, 34° 56' 58.364''W). It was selected green and healthy leaves, that is visually intact, free of pests, diseases or altered color. A voucher specimen was identified by Marlene Barbosa and is deposited in the Herbarium Geraldo Mariz of the Universidade Federal de Pernambuco.

Obtaining and chemical characterization of pectin

Pectin extraction

For pectin extraction, the leaves of *C. tapia* (100 g), was submitted one aqueous extraction, in proportion (g/mL) 1:1 in 2 L stirred tank at (60°C/1200 rpm/ 4 h). The liquid obtained in the extraction steps was subjected to precipitation with ethanol 100%. The solid pectin precipitated was dried at 70°C for approximately 24 h.

Chemical characterization of pectin using ATR-FTIR

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis of *C. tapia* pectin was performed on a Bruker Tensor 27 spectrometer using the attenuated total reflectance accessory (Platinum ATR). The spectra were recorded in the spectral range from 4000 to 500 cm⁻¹, with a resolution of 2 cm⁻¹ and 20 scans.

Antioxidant assays

Different antioxidant assays were performed using decreasing concentrations of pectin (1000 to 3.9 µg/mL). Total antioxidant activity (TAA), DPPH free radical sequestration activity, ABTS radical cation elimination activity and nitric oxide radical scavenging assay were performed in accordance with Cruz-Filho et al. (2019) protocols. To determination of reducing power, each concentration of Pectin were mixed with phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide (2.5 mL, 1%, w/v), incubated at 50 °C for 20 min, to discover the ferric-ferrocyanide concentration, second Aadil et al. (2014) protocol. For the iron (Fe²⁺) chelating activity, each pectin sample was mixed with methanol and FeCl₃ (250 mM), incubated at 25 °C for 10 min and then ferrozine (2 mM) was added to this solution (Barapatre et al., 2016). The Fe²⁺ chelating ability was presented in % chelation and calculated as follows: Fe²⁺ chelating ability (%) = [A₀ - (A₁ - A₂)] / A₀ X 100 where, A₀ stands for absorbance of the control, A₁ for absorbance of the samples or standard, and A₂ for absorbance of

the blank. EDTA was used as a reference. For all assays ascorbic acid was used as standard.

Cytotoxic and immunological assays

Preparation, culture and in vitro stimulation of PBMCs

The isolation of lymphocytes and monocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was performed according with Melo et al. (2011). Experimental protocols were approved by the Ethics Committee from the Federal University of Pernambuco. The blood samples were only collected after all of health voluntaries signed a "Term of Free and Informed Consent". After three centrifugations, cells were counted in a Neubauer chamber, using the trypan blue solution. Cells were only used when viability was >95%. PBMCs were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (w/v) fetal bovine serum in 24-well plates at a density of 10^6 cells/well. For analysis of viability, the cells were treated with the pectin in different concentrations and the stimulus was maintained for 24 h.

Cytotoxicity analysis

As PBMC foram tratadas com pectina por 24 horas e a morte celular foi analisada usando iodeto de propídio de acordo com o protocolo descrito por Santos et al. (2018). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACS Calibur (BD Biosciences-USA®) e os resultados foram analisados no Flowing Software 2.5.1®

Measurement of cytokines and nitrite production

Cytokines and nitrite were quantified in supernatants of PBMC cultures treated with the pectin (10 µg/mL) for 24 hours of incubation. Cytokine assessment was carried out using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine kit (BD Biosciences-USA®) for detection of the interleukins IL-2, -4, -6, -10, TNF- α and IFN- γ as described by Santos et al. (2018a). The data were acquired on the FACS Calibur platform (BD Biosciences-USA®) and the results were analyzed using Flowing Software 2.5.1®. Nitrite concentration was estimated using Griess method (Ding et al., 1988). A standard curve ($y = 0.007x + 0.0256 / R^2 = 0.9978 / 3.12-400 \mu\text{mol}$) was found in assay. The reading was carried out in a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan FC®, Waltham-USA) at 595 nm.

Immunophenotyping assay

The lymphocyte immunophenotyping assays were performed according to Santos et al. (2018). The monoclonal antibodies used were anti-CD4-PerCP and anti-CD8-FITC (BD®). Flow cytometry was performed on a FACS Calibur platform (BD Biosciences-USA®) and the results were analyzed using the Flowing Software 2.5.1®.

Statistical analysis

The results presented in this study correspond to the average of three repetitions \pm standard deviation from the mean. Statistical analysis was performed through analysis of variance and the significant differences between the means were determined by the Tukey test, at the level of 5% probability ($P < 0.05$).

TABLE

Table S1. Antioxidant activity of pectin at concentrations of 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Antioxidant assays	Pectin	Ascorbic acid
	% (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	% (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
TAA	26.4 \pm 0.26	100 \pm 0.00
ABTS	41.16 \pm 0.30	90.47 \pm 0.34
AQ	ND	80.3 \pm 0.10
AR	ND	76.50 \pm 0.90
DPPH	25.9 \pm 0.01	91.05 \pm 0.17
NO	7.6 \pm 1.95	95.42 \pm 0.80
Kidnapping (H:O ₂)	ND	ND

Mean \pm deviation

ND: Not detected

FIGURES

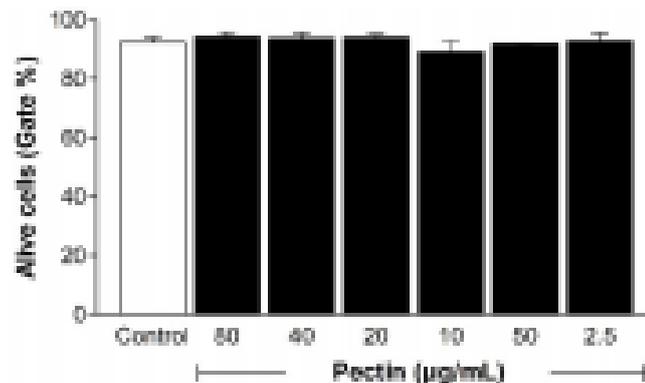


Figure S1: Viability of human PBMCs treated with pectin of leaves of *C. taptia* at different concentrations. The pectin not promote significant cell death. Vertical bars represent the average of two independent experiments performed in quadruplicate.

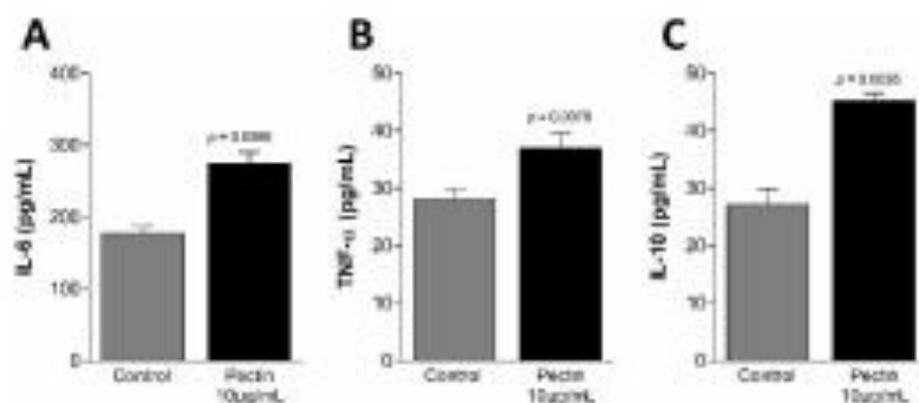


Figure S2: Immunostimulatory effect of pectin of leaves of *C. tapia* on human PBMCs cultures in 24 h of incubation. Vertical bars represent the average of two independent experiments performed in quadruplicate.

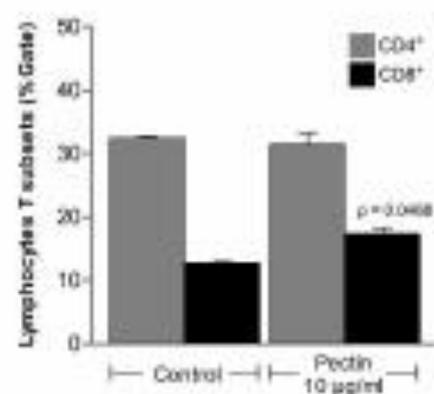


Figure S3: Activation of T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocyte subsets by pectin from *C. tapia* leaves. The total lymphocyte count showed that the CD8⁺ T lymphocyte subset has a higher value compared to the control cells ($p = 0.0468$). Vertical bars represent the average of three independent experiments performed in duplicate.

REFERENCES

Cruz Filho, Iranildo José, et al. "Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production." *International journal of biological macromolecules* 123 (2019): 1331-1339.

Barapatre, Anand, et al. "In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*." *International journal of biological macromolecules* 86 (2016): 443-453.

De Melo, C. M. L., Melo, H., Correia, M. T., Coelho, L. C. B. B., da Silva, M. B., & Pereira, V. R. A. (2011). Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1, 4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scandinavian journal of immunology*, 73(2), 112-121