

9º

ENCONTRO QUÍMICA DOS ALIMENTOS

QUALIDADE E SUSTENTABILIDADE:
UMA ABORDAGEM INTEGRADA

ORGANIZAÇÃO



ENTIDADES FINANCIADORAS

Representante
da República
para os Açores



FUNDAÇÃO
LUSO-AMERICANA





FICHA TÉCNICA

TÍTULO

9º ENCONTRO QUÍMICA DOS ALIMENTOS

EDIÇÃO

Sociedade Portuguesa de Química e
Centro de Investigação e Tecnologia Agrária dos Açores (CITAA)

DESIGN GRÁFICO, FOTOGRAFIA António Araújo

IMPRESSÃO Nova Gráfica

TIRAGEM 250 ex.

DEPÓSITO LEGAL 292867/09

DATA Abril de 2009

COMPOSIÇÃO GLICOSÍDICA E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE INFUSÕES DE FOLHAS DE FREIXO (*FRAXINUS ANGUSTIFOLIA*)

Vitor M.R. Martins^{a,b,*}, Manuel A. Coimbra^b

^aCIMO, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5301-855 Bragança, Tel. +351-273303208, Fax +351-273325405, e-mail: vmartins@ipb.pt

^bQOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal

Palavras-chave: plantas medicinais, infusões, polissacarídeos, actividade antioxidante.

Resumo: Neste trabalho foram preparadas infusões de folhas de freixo secas. Cada infusão foi dividida em duas fracções, tendo uma sido utilizada para a obtenção do material polimérico por diálise (Dial) e a outra submetida a uma extracção em fase sólida C₁₈, sendo a fase aquosa recolhida composta pelo material não retido (C₁₈ H₂O) e a fracção de metanol composta pelo material retido e eluído neste solvente (C₁₈ MeOH). A análise da composição glicosídica mostrou que a fracção C₁₈ H₂O era rica em glucose e manose; a fracção C₁₈ MeOH era rica em glucose e a fracção Dial era rica em ácidos urónicos, arabinose, galactose e glucose. A fracção C₁₈ H₂O era a mais pobre em compostos fenólicos e a que apresentou menor actividade antirradicalar. As fracções C₁₈ MeOH e Dial apresentaram actividades antirradicalares semelhantes entre si, apesar de possuírem quantidades de compostos fenólicos totais distintas. A fracção Dial, constituída por material de peso molecular superior a 12-14 kDa, foi ainda sujeita a uma análise de ligações glicosídicas, através da análise por GC-MS dos respectivos acetatos de alditol parcialmente metilados. O resultado obtido permitiu inferir a presença de resíduos glicosídicos característicos de arabinogalactanas do tipo II, xiloglucanas e xilanas.

1. INTRODUÇÃO

A utilização com fins medicinais de infusões preparadas a partir da planta *Camilla sinensis*, o chá, é uma prática bastante comum e antiga, cujos aspectos químicos são bem conhecidos [1]. No entanto, na medicina popular existe uma grande diversidade de plantas que são utilizadas na forma de infusões com fins medicinais. Embora a actividade biológica e os potenciais efeitos benéficos para a saúde de algumas dessas infusões esteja documentada, como é o caso da infusão de camomila [2], a utilização da maioria das infusões baseia-se num conhecimento empírico, sem uma base científica sólida. Em algumas regiões de Portugal, nomeadamente na região de Trás-os-Montes, a utilização de infusões de plantas para fins medicinais tem larga tradição [3]. Entre as plantas utilizadas podemos encontrar o freixo (*Fraxinus angustifolia*), mais precisamente as suas folhas secas, utilizadas pelas populações para a preparação de infusões em situações de hipertensão arterial, reumatismo e ácido úrico [3].

Os benefícios das infusões de plantas estão relacionados com a presença de compostos fenólicos, óleos essenciais e polissacarídeos, entre outros. Apesar dos compostos fenólicos e óleos essenciais serem objecto de estudo há mais de duas décadas, a estrutura dos polissacarídeos presentes nas infusões de plantas, bem como o seu contributo para os benefícios para a saúde, são escassos. De facto, os polissacarídeos provenientes de diversas origens botânicas, como cogumelos, algas, líquenes e plantas superiores têm despertado a atenção devido às suas propriedades terapêuticas e relativamente reduzida toxicidade [4], demonstrando um elevado potencial para utilização como compostos com acção imunomoduladora, antitumoral e curativa de feridas. Os polissacarídeos normalmente associados a estes efeitos são as arabinogalactanas [5, 6, 7], no entanto, as β -(1-3) glucanas,

glucomananas acetiladas e ramnoglacturonanas também possuem actividade biológica [8]. Na literatura, as referências à actividade biológica das xilanas são relativamente escassas, no entanto, recentemente foi relatada a presença nas sementes de algumas plantas de compostos deste tipo que apresentaram actividade imunomoduladora [9].

Neste trabalho foram preparadas infusões de folhas de freixo secas, que foram utilizadas para a caracterização do material glicosídico e respectiva actividade antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação das infusões e respectivas fracções

Preparam-se infusões, em triplicado, com 20 gramas de folhas secas de freixo. Adicionaram-se 150 mL de água destilada em ebulição e deixou-se o material vegetal em contacto durante 5 min. A infusão foi filtrada e dividida em duas porções de volumes iguais. Uma das porções foi dialisada (MWCO 12-14 kDa), dando origem à fracção Dial. A outra porção foi aplicada num cartucho comercial de extracção em fase sólida (SPE) C₁₈ que foi eluído com água destilada, dando origem à fracção C₁₈ H₂O. A eluição com metanol acídico (0,1%) do material retido deu origem à fracção C₁₈ MeOH. As fracções obtidas foram concentradas e liofilizadas.

2.2. Análise de açúcares e de ligações glicosídicas

Os açúcares neutros foram quantificados por GC-FID, após hidrólise de Saeman e derivatização a acetatos de alditol [10,11]. Os ácidos urónicos foram quantificados pelo método colorimétrico de Blumenkrantz e Asboe-Hansen [12], tal como descrito por Coimbra *et al.* [13].

2.3. Compostos fenólicos totais e actividade antirradicalar

Os compostos fenólicos totais (CF) foram determinados através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu [14], utilizando como padrão o ácido gálico. Os resultados foram expressos como miligramas de ácido gálico por grama de material.

A actividade antioxidante dos extractos foi medida de acordo com a actividade antirradicalar, determinada pelo método do DPPH tal como descrito por Hatano *et al.* [15] e expressa em termos do respectivo EC₅₀, definido como a concentração de extracto que inibe em 50% a formação de radicais DPPH. A percentagem de inibição da formação de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) foi calculada através da expressão:

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{\text{DPPH}} \times A_{\text{Amostra}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100. \quad (1)$$

2.4. Análise de ligações glicosídicas

Os polissacarídeos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido, activados com hidróxido de sódio e metilados com iodeto de metilo [15,16], tal como descrito por Coimbra *et al.* [13]. O material obtido foi hidrolizado com ácido trifluoroacético 2 M a 100°C, durante 30 min., e os monossacarídeos parcialmente metilados foram reduzidos com boro-hidreto de sódio deuterado e acetilados com anidrido acético, utilizando 1-metilimidazole como catalizador. Os acetatos de alditol parcialmente metilados foram identificados e quantificados por GC-MS.

2.5. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada, com recurso ao *software* estatístico “SPSS Statistics 17.0”, através de análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para comparação de médias (nível de significância de $p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Quantidade total de material e rendimento glicosídico

O valor da massa total de cada uma das fracções obtidas e o respectivo rendimento em açúcares encontram-se na Figura 1. A fracção C18 H₂O deu origem a quantidades de material superiores (818±40 mg), enquanto a fracção Dial proporcionou as menores quantidades de material total (19,4±0,9 mg) (Figura 1a). A quantidade de material polimérico representa 2% do material total recolhido a partir da infusão.

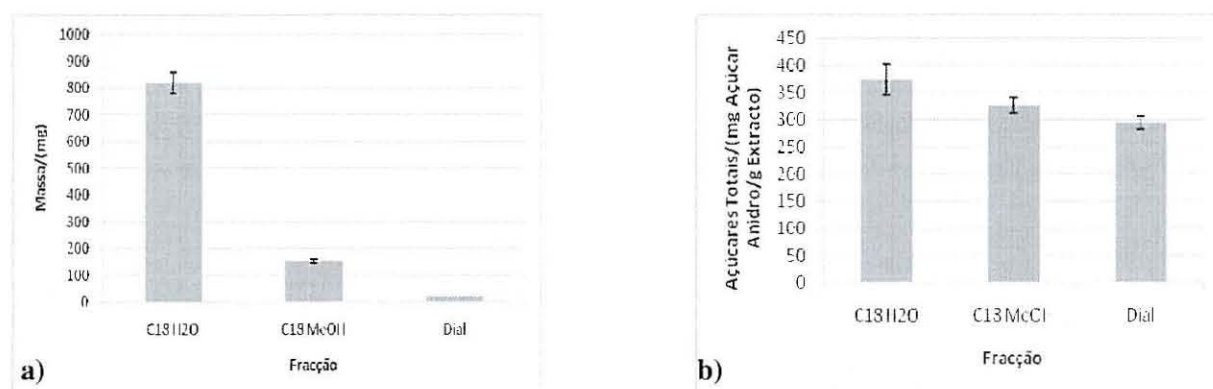


Figura 1 – a) Quantidade total de material e b) quantidade de açúcares das fracções obtidas a partir da infusão de folhas secas de freixo

A Figura 1b mostra que a percentagem de açúcares presente em cada fracção obtida foi bastante semelhante, entre os 37% (C18 H₂O) e os 29% (Dial). No caso desta última fracção, este resultado permite concluir que os polissacarídeos correspondem a 29% do material polimérico da infusão e menos de 1% do material total recolhido.

3.2. Composição glicosídica das fracções

A composição glicosídica das três fracções obtidas mostrou ser variada (Figura 2). A fracção C18 H₂O é rica em manose (50,1±3,4 %) e glucose (32,8±5,8 %), a fracção C18 MeOH é rica em glucose (69,4±2,7 %) e a fracção Dial é rica em arabinose (15,2±1,9 %), galactose (17,7±0,4 %), glucose (30,1±1,3 %) e ácidos urónicos (18,9±2,9 %).

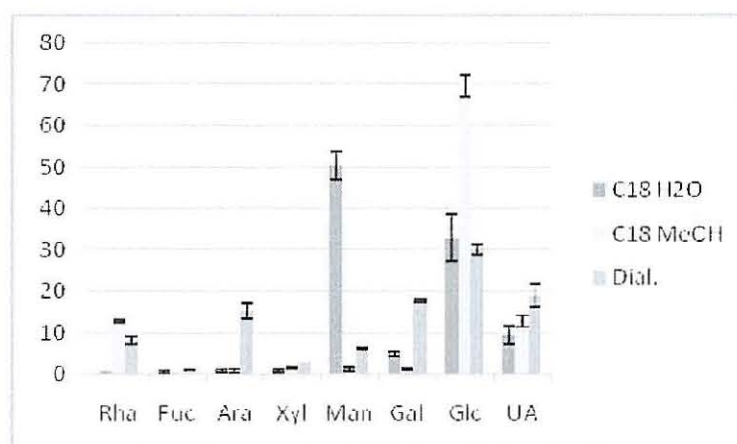


Figura 2 – Composição glicosídica, expressa em percentagens molares, das fracções obtidas a partir da infusão de folhas secas de freixo

3.3. Compostos fenólicos e actividade antirradicalar

A Figura 3a mostra que as três fracções obtidas apresentaram quantidades distintas de compostos fenólicos totais, sendo a fracção C18 MeOH a mais rica (176 ± 17 mg CF/g extracto), enquanto a fracção C18 H₂O foi a mais pobre ($18,2 \pm 2,0$ mg CF/g extracto).

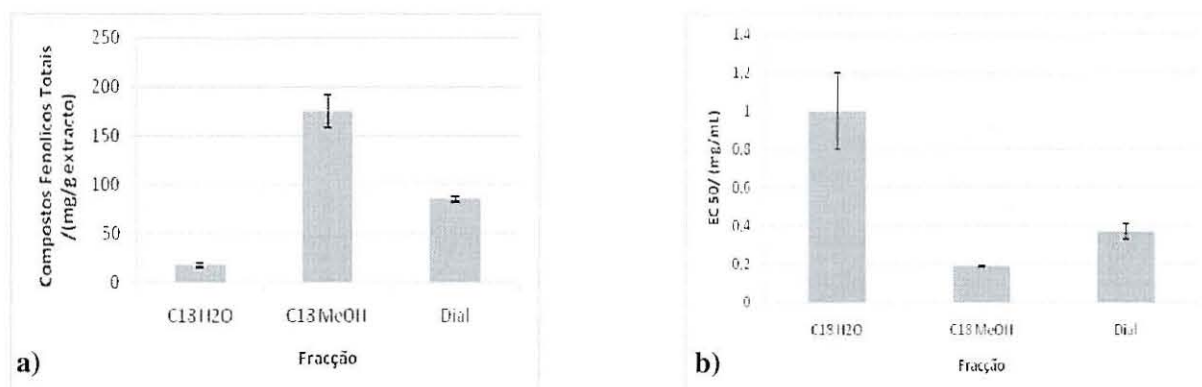


Figura 3 – a) Quantidade de compostos fenólicos totais, expressa em miligrama de compostos fenólicos totais por grama de extracto obtido, e b) actividade antirradicalar das fracções obtidas a partir da infusão de folhas secas de freixo

Durante a eluição dos cartuchos de SPE C₁₈ com água, a maioria dos compostos fenólicos ficou retida na fase estacionária, dando origem a fracções relativamente pobres em compostos fenólicos (C18 H₂O). A eluição com metanol removeu a maior parte dos compostos fenólicos presentes na infusão, dando origem às fracções C18 MeOH, ricas em compostos fenólicos. Este facto parece indicar a presença nas infusões de uma elevada quantidade de compostos fenólicos de maior hidrofobicidade relativamente a compostos fenólicos de menor hidrofobicidade. A fracção Dial apresentou uma quantidade de compostos fenólicos totais intermédia, correspondente a compostos fenólicos associados a polissacarídeos e/ou a material proteico.

As fracções C18 H₂O (EC₅₀ de $1,0 \pm 0,2$ mg/mL) e C18 MeOH (EC₅₀ de $0,19 \pm 0,00$ mg/mL) apresentaram uma actividade antirradicalar significativamente distinta, enquanto a fracção Dial apresentou um valor de EC₅₀ um pouco superior à da fracção C18 MeOH (Figura 3b), mostrando que o material polimérico apresenta uma capacidade antirradicalar comparável à que se encontra nos compostos fenólicos livres presentes na fracção C18 MeOH.

3.4. Ligações glicosídicas

Com o objectivo de compreender que tipo de polissacarídeos estaria presente na fracção Dial, realizou-se uma análise de metilação (Tabela 1).

Os resultados obtidos, mostraram a presença de resíduos de galactose em ligação (1→3), (1→6) e (1→3,6), na proporção (1:5:3), para além de uma quantidade elevada de resíduos de arabinose em ligação terminal, diagnósticos da presença de arabinogalactanas do tipo II [18]. Foram também detectados resíduos de glucose em ligação (1→4), resíduos de xilose em ligação (1→2) e terminal, para além de resíduos de galactose e fucose em ligação terminal, permitindo inferir a presença de xiloglucanas. Embora detectados em reduzida quantidade, a presença de resíduos de xilose, em ligação (1→4) poderá indiciar a presença de xilanas.

Tabela 1 – Composição das ligações glicosídicas da fracção Dial.

Ligação	% Molar
T-Rhap	6,9
2-Rhap	1,1
Rha Total	8,0^a (10,1)^b
T-Fucp	1,2
Fuc Total	1,2 (1,2)
T-Araf	13,8
2-Araf	1,0
3-Araf	3,4
5-Araf	5,0
Ara Total	23,2 (18,7)
T-Xylp	3,9
2-Xylp	0,5
4-Xylp	0,9
2,4-Xylp	1,7
Xyl Total	7,0 (3,5)
2-Manp	0,8
4-Manp	5,2
4,6-Manp	1,0
Man Total	7,0 (7,5)
T-Galp	6,3
3-Galp	1,8
6-Galp	8,9
3,6-Galp	5,6
Gal Total	22,6 (21,8)
T-Glcp	13,8
4-Glcp	10,1
6-Glcp	7,1
Glc Total	31,0 (37,1)

^a percentagem molar total obtida através da análise de metilação

^b percentagem molar obtida através da análise de açúcares

4. CONCLUSÕES

As infusões das folhas de freixo apresentam uma fracção de material polimérico com actividade antioxidante e cujas ligações glicosídicas apontam para a presença de arabinogalactanas, xiloglucanas e, eventualmente, xilanas. Alguns destes polissacarídeos têm sido descritos como possuindo actividades benéficas para a saúde. Também a fracção hidrofóbica (C18 MeOH) é rica em compostos fenólicos e possui elevado poder antirradicalar. Estes extractos merecem atenção num futuro trabalho de caracterização.

Referências

- [1] – D.S Wheeler, W.J. - *Drug Dev. Res.* **61** (2004) 45-65
- [2] – D. L McKay, J.B. Blumberg - *Phytother. Res.* **20** (2006) 510-530
- [3] – A. M. P. Carvalho - *Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho. Plantas, tradición y saber popular en un territorio del nordeste de Portugal. Tese de Doutoramento-Universidad Autónoma de Madrid* (2005)
- [4] – I.A. Schepetkin, M.T. Quinn - *Int. Immunopharmacol.* **6** (2006) 317–333
- [5] – T.R. Cipriani, C.G. Mellinger, L.M. de Souza, C.H. Baggio, C.S. Freitas, M.C.C. Marques, P.A.J. Gorin, G.L. Sasaki, M. Iacomini - *J. Nat. Prod.* **69** (2006) 1018-1021
- [6] – C.G. Mellinger, E.R. Carbonero, G.R. Noleto, T.R. Cipriani, M.B.M Oliveira, P.A.J. Gorin, M. Iacomini - *J. Nat. Prod.* **68** (2005) 1479-1483
- [7] – F. Dourado, P. Madureira, V. Carvalho, R. Coelho, M.A. Coimbra, M. Vilanova, M. Mota, F.M. Gama - *Carbohydr. Res.* **339** (2004) 2555-2566
- [8] – B.S. Paulsen, B.S. - *Phytother. Res.* **1** (2002) 379-387
- [9] – M.M.T. Rosário, G.R. Noleto, J.F. Bento, F. Reicher, M.B.M. Oliveira, C.L.O. Petkowicz, C.L.O. - *Phytochem.* **69** (2008) 464-472
- [10] – A.B. Blakeney, P.J. Harris, R.J. Henry, B.A. Stone B. A. - *Carbohydr. Res.* **113** (1983) 291-299
- [11] – P.J. Harris, A.B. Blakeney, R.J. Henry, B.A. Stone, B. A. - *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71** (1988) 272-275
- [12] – N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen, G. - *Anal. Biochem.* **54** (1983) 484-489
- [13] – M.A. Coimbra, I. Delgadillo, K.W. Waldron, R.R. Selvendran - *Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp. In Plant Cell Wall Analysis; Linskens, H. F., Jackson, J. F., Eds.; Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 17; Springer-Verlag, Heidelberg* (1996) 19-44
- [14] – V.L. Singleton, J.A. Rossi - *Am. J. Enol. Vitic.* **16** (1996) 144–153
- [15] – T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara, T. Okuda, T. - *Chem. and Pharmaceut. Bull.* **36** (1988) 2090–2097
- [16] – I. Ciucanu, F. Kerek - *Carbohydr. Res.* **131** (1984) 209-217
- [17] – A. Isogai, A. Ishizu, J. Nakano - *Carbohydr. Res.* **138** (1985) 99-108
- [18] – F.M. Nunes, M.A. Coimbra, M. A. - *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 1773-1782