

Danieli Hofmann Pereira

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS FOLIARES DA *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL. (ERVA MATE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS. Área de concentração: Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Dra. Rochele Cassanta Rossi

Co-orientadora: Dra. Renata Cristina de Souza Ramos

Co-orientadora: Dra. Laura Massochin Nunes Pinto

**SÃO LEOPOLDO**

**2015**

## Ficha catalográfica

P436i Pereira, Danieli Hofmann

Isolamento e caracterização de proteínas foliares da *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva mate) / por Danieli Hofmann Pereira. – 2015.

51 f. : il., 30 cm.

Dissertação (mestrado) — Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Rochele Cassanta Rossi ;  
Coorientação: Profa. Dra. Renata Cristina de Souza Ramos,  
Profa. Dra. Laura Massochin Nunes Pinto.

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Proteínas. 3. Compostos bioativos.  
4. Atividade antioxidante. I. Título.

Catologação na Fonte:

Bibliotecária Vanessa Borges Nunes - CRB 10/1556

**Danieli Hofmann Pereira**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS FOLIARES DA *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL. (ERVA MATE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS. Área de concentração: Nutrição e Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Ms. Daiana de Souza – Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS**

---

**Prof. Dr. Juliano Garavaglia – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA**

---

**Prof. Dr. Rochele Cassanta Rossi – Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS**

## RESUMO

A *Ilex paraguariensis* é uma planta da família Aquifoliaceae, nativa da região subtropical da América do Sul e consumida e produzida em larga escala nas regiões meridionais do Brasil. O interesse na planta vem aumentando a medida que estudos são desenvolvidos mostrando diversos benefícios da *Ilex paraguariensis*. A maioria destas pesquisas associa a atividade antioxidante da planta à sua composição fenólica. Entretanto, como estudos com outras fontes vegetais também relacionam as propriedades antioxidantes a compostos bioativos proteicos é importante a avaliação e caracterização das proteínas foliares de *Ilex paraguariensis*, uma vez que compostos bioativos naturais podem ser utilizados para a saúde como complementos ou ingredientes funcionais. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi caracterizar as proteínas foliares de *Ilex paraguariensis*. Para tanto, folhas da planta passaram por diferentes processos de extração e fracionamento. Inicialmente, o material vegetal foi homogeneizado com Tampão Tris HCl 50 mM, pH 8, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM, 5% de Glicerol e 0,1% de Triton X100, filtrado e centrifugado; posteriormente precipitado com diferentes concentrações de sal e ainda dialisado e separado por membrana de ultrafiltração. As amostras obtidas em cada etapa deste processo foram avaliadas quanto à quantidade de proteínas, polifenóis totais, caracterização de perfil proteico (SDS-PAGE) e atividade antioxidante. Em relação a caracterização proteica, a concentração foliar obtida foi de 5,29 a 36,47 mg/mL. O perfil dos proteico, através de SDS-PAGE, evidenciou bandas com peso molecular entre 3 e 188 kDa. Quanto a análise dos polifenóis totais, foram obtidos valores de 0,125 a 0,338 mg EAG/mL. Todas as amostras possuíram atividade antioxidante, entretanto, a avaliação isolada das mesmas identificou que grande parte desta atividade pode ser atribuída ao composto proteína-polifenóis presente na Fração III A. Esta amostra possui uma banda proteica de aproximadamente 10 kDa que quando isolada continuou a apresentar uma grande capacidade antioxidante.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, proteínas, compostos bioativos, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

The *Ilex paraguariensis* is a plant from Aquifoliaceae family, native from subtropical South America, consumed and produced on a large scale in the southern regions of Brazil. The interest in the plant is increasing as studies are developed showing many benefits of *Ilex paraguariensis*. Most of these studies associate the antioxidant activity with its phenolic composition. However, since studies with other plant sources have also correlated the antioxidant properties with proteinaceous bioactive compounds it is important the evaluation and characterization of the *Ilex paraguariensis* proteins leaves, since bioactive compounds can be used as supplements for health or functional ingredients. In this context, the aim of this study was to characterize the foliar proteins from *Ilex paraguariensis*. Therefore, the leaves have gone through different extraction processes and fractionation. Initially, the plant material was homogenized with 50 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5% glycerol and 0.1% Triton X100 buffer, than filtered and centrifuged; subsequently the material was precipitated at different salt concentrations, dialyzed and further separated through ultrafiltration membrane. The samples from each step of this process were evaluated for the amount of protein, total polyphenols, protein profile characterization (SDS-PAGE) and antioxidant activity. Regarding protein characterization, foliar concentration obtained was 5.29 to 36.47 mg/mL. The protein profile by SDS-PAGE showed bands with a molecular weight between 3 and 188 kDa. As for analysis of total polyphenols, values from 0.125 to 0.338 mg GAE/mL were obtained. All samples had antioxidant activity, however, the isolate evaluation of those showed that much of this activity can be attributed to the protein-polyphenol compound present in Fraction III A. This sample had a protein band of approximately 10 kDa that when isolated continued to present a great antioxidant capacity.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, proteins, bioactive compounds, antioxidant activity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Regiões do país que consomem e produzem Erva Mate em grande escala  
----- 12
- Figura 2. *Ilex paraguariensis*: árvore, folha, fruto e flor ----- 13
- Figura 3: SDS-PAGE do Extrato Bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII) e Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*. Marcador de peso molecular See Blue Pre-Stained Standard (M) ----- 28
- Figura 4: Cinética de captura do radical livre DPPH do extrato bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII) e Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* ----- 31
- Figura 5: SDS-PAGE da Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*. Marcador de peso molecular See Blue Pre-Stained Standard(M) ----- 34
- Figura 6: Cinética de captura do radical livre DPPH da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* ----- 36

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Ações relacionadas ao consumo da *Ilex paraguariensis* de formas variadas e respectivos estudos que apresentam relação com a ação ----- 15
- Tabela 2. Média da composição química de Extrato de Erva Mate ----- 16
- Tabela 3 – Quantificação de proteínas do extrato bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII) e Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* pelo método de Bradford (1976) ----- 29
- Tabela 4: Quantificação de polifenóis totais do extrato bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII), Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* ----- 30
- Tabela 5: Porcentagem de DPPH remanescente do extrato bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII) e Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* nos tempos 2,5 minutos e 30 minutos ----- 31
- Tabela 6: Atividade antioxidante do extrato bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII) Fração III (FIII), e Fração Total obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* através de cálculo por equivalente de Trolox ----- 32
- Tabela 7 – Quantificação de proteínas da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* pelo método de Bradford (1976) ----- 35
- Tabela 8: Quantificação de polifenóis totais da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* ----- 36
- Tabela 9: Porcentagem de DPPH remanescente da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* nos tempos 2,5 minutos e 30 minutos ----- 37
- Tabela 10: Atividade antioxidante da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* através de cálculo por equivalente de Trolox ----- 38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>11</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 <i>Ilex paraguariensis</i></b> .....	<b>12</b>
3.1.1 Definição e histórico .....	12
3.1.2 Fisiologia da <i>Ilex paraguariensis</i> .....	13
3.1.3 Composição e propriedades bioativas.....	14
<b>3.2 Proteínas</b> .....	<b>16</b>
3.2.1 Definição .....	16
3.2.2 Proteínas foliares .....	17
<b>3.3 Atividade Antioxidante</b> .....	<b>18</b>
3.3.1 Radicais livres e o estresse oxidativo.....	18
3.3.2 Ação antioxidante de proteínas e peptídeos .....	19
3.3.3 Compostos fenólicos .....	20
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 <i>Ilex paraguariensis</i></b> .....	<b>22</b>
<b>4.2. Aquisição dos produtos químicos e reagentes</b> .....	<b>22</b>
<b>4.3 Obtenção do extrato bruto</b> .....	<b>22</b>
<b>4.4 Obtenção das frações proteicas</b> .....	<b>22</b>
<b>4.5 Dosagem de proteínas</b> .....	<b>23</b>
<b>4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)</b> .....	<b>23</b>
4.6.1 Fotodocumentação.....	24
<b>4.7 Compostos fenólicos solúveis totais</b> .....	<b>24</b>
<b>4.8 Atividade antioxidante</b> .....	<b>24</b>
4.8.1 Cinética de sequestro do radical DPPH .....	25
4.8.2 Atividade antioxidante por equivalente de Trolox .....	25



<b>4.9 Análises estatísticas .....</b>	<b>25</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Análises do extrato bruto e frações proteicas foliares da <i>Ilex paraguariensis</i> .....</b>	<b>27</b>
5.1.1 Obtenção do extrato bruto e frações proteicas foliares da <i>Ilex paraguariensis</i> ..	27
5.1.2 Caracterização das bandas proteicas do extrato bruto e frações proteicas através de eletroforese (SDS-PAGE).....	27
5.1.3 Quantificação proteica do extrato bruto e frações proteicas através do método de Bradford .....	28
5.1.4 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato bruto e frações proteicas .....	29
<b>5.2 Análises das frações proteicas III, III A e III B foliares da <i>Ilex paraguariensis</i> .....</b>	<b>33</b>
5.2.1 Caracterização das bandas proteicas das frações proteicas III A e III B através de eletroforese (SDS-PAGE).....	33
5.2.2 Quantificação proteica das frações proteicas III, III A e III B através do método de Bradford .....	35
5.2.3 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das frações proteicas III, III A e III B .....	35
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>40</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* St. Hil., popularmente conhecida como Erva Mate ou Mate, é uma planta da família Aquifoliaceae, nativa da região subtropical da América do Sul, consumida e produzida em regiões do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. (HECK; MEJIA, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Com a submissão temporária à ação do fogo e moagem dos ramos enfolhados desta planta, é feito uma infusão, consumida e utilizada tanto como uma fonte de cafeína, como agente terapêutico devido às suas alegadas propriedades farmacológicas. (BRACESCO et al., 2011).

Diversas propriedades funcionais dos alimentos de origem vegetal têm sido estudadas e descritas, mostrando a relação de frutos, folhas e sementes e a atividade antioxidante, normalmente relacionada ao teor de compostos fenólicos. (CHANDRAS; MEJIA, 2004). Recentemente, a utilização de proteínas purificadas ou extratos naturais de proteínas com capacidades antioxidantes tem atraído particular interesse de diversos pesquisadores (CHIUE et al., 1997; SATUE-GRACIA et al., 2000; ZHAO et al., 2004). Estas proteínas, derivadas de alimentos, podem ter efeitos benéficos sobre a saúde humana. (MOLLER et al., 2008). Proteínas são macromoléculas, constituídas por uma ou mais cadeias de resíduos aminoácidos. São os componentes essenciais dos organismos e participam em praticamente todos os processos celulares. (LE GUERROUÉ, 1996).

Diversos estudos relatam os benefícios da Erva Mate. Suas atividades incluem atividade antioxidante, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, antibacteriana, diurética, entre diversas outras. Entretanto, são escassos os estudos avaliando as proteínas de *Ilex paraguariensis*, especialmente das folhas desse vegetal. O estudo das proteínas e suas atividades é importante para a indústria de alimentos, uma vez que compostos bioativos naturais podem ser utilizados para a saúde, como complementos ou ingredientes funcionais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a atividade antioxidante de extratos proteicos foliares de *Ilex paraguariensis*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) obter o extrato proteico foliar de *Ilex paraguariensis*;
- b) avaliar a concentração total de proteínas obtidas a partir do extrato foliar e frações;
- c) caracterizar o perfil proteico do extrato e das frações através de eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- d) analisar a atividade antioxidante do extrato proteico e das frações obtidas;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Ilex paraguariensis*

##### 3.1.1 Definição e Histórico

A *Ilex paraguariensis*, mais conhecida como Erva Mate ou Mate, é uma planta da família Aquifoliaceae. Nativa da região subtropical da América do Sul, é consumida e produzida em larga escala nas regiões meridionais do Brasil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo), Argentina (Corrientes, Misiones), Paraguai (Alto Paraná, Amambay, Caaguazu, Canendiyu, Central, Guaira, Itapua, Misiones, San Pedro) e Uruguai (Figura 1). (HECK; MEJIA, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Figura 1. Regiões do país que consomem em produzem Erva Mate em grande escala.



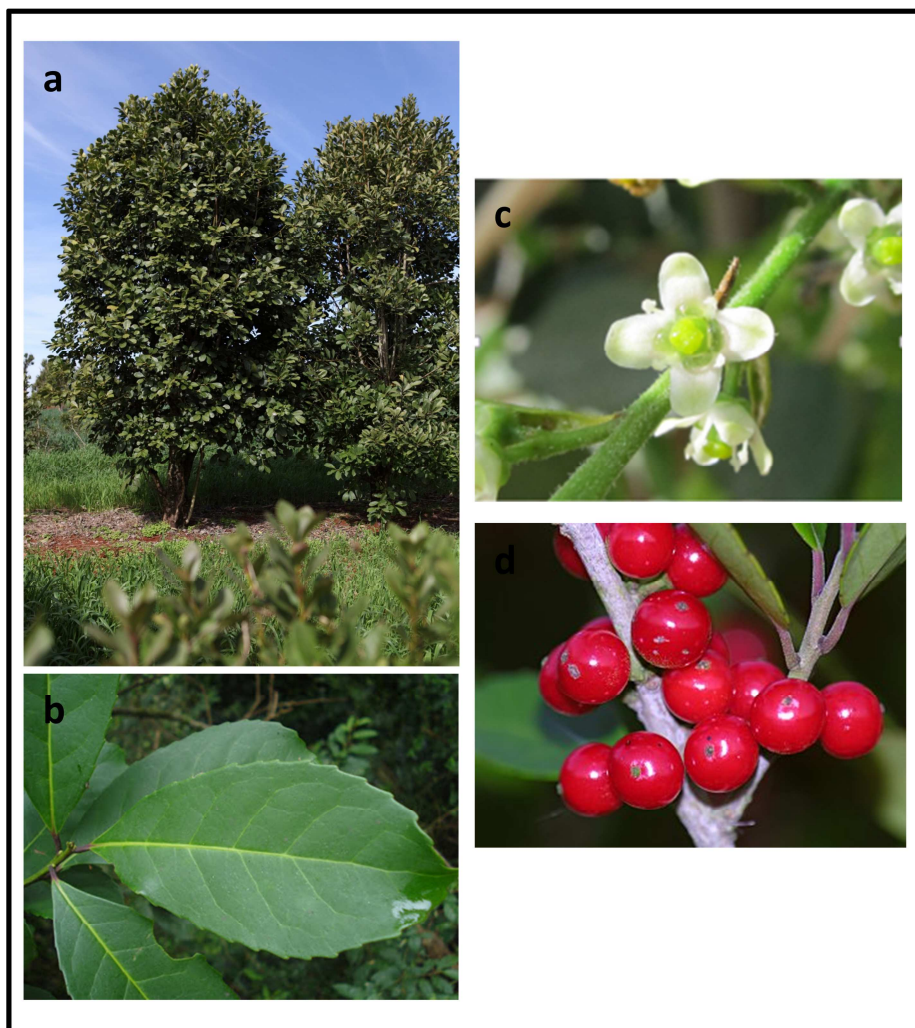
Fonte: <http://neccint.wordpress.com/direito-internacional/arena-de-ideias/mercosul/o-brasil-na-america-latina-mercosul/> - Imagem modificada pela autora.

Com as folhas sapecadas e moídas de *Ilex paraguariensis*, é feito uma infusão muito consumida por populações na América do Sul. Esta começou a ser utilizada pelo grupo étnico Guarani e é uma bebida que tem um rol social e quase ritualístico em algumas sociedades modernas da América do Sul (BRACESCO et al., 2011).

### 3.1.2 Fisiologia da *Ilex paraguariensis*

A *Ilex paraguariensis* é uma espécie de árvore perene dioica, que pode crescer a uma elevação de 8 até 15 metros. As folhas verde-oliva são longas, com cerca de oito centímetros, alternas, coriáceas, obovadas com margens ligeiramente dentadas, e tem uma base em forma de cunha. Os pecíolos são de até 15 milímetros de comprimento. A fase de floração ocorre durante a estação da primavera, produzindo pequenas flores unissexuadas as quais possuem 4 pétalas brancas. Em algumas espécies tropicais ou subtropicais, o número de pétalas pode ser 5, 6 ou 7. Estas podem ser agrupadas em grupos de 1 a 15 flores que aparecem na axila das folhas. Os frutos são bagas de cor vermelha contendo de 4 a 5 sementes (Figura 2). (BRACESCO et al., 2011).

Figura 2. *Ilex paraguariensis*: (a) árvore, (b) folha, (c) fruto e (d) flor.



A respeito da estrutura foliar, internamente, a estrutura anatômica da folha compreende três sistemas de tecidos: sistema dérmico – reveste toda a superfície foliar; sistema fundamental – constitui o mesófilo da lâmina foliar e o córtex da nervura mediana e do pecíolo; e o sistema vascular – constituído pelos tecidos vasculares das nervuras. A folha apresenta duas superfícies: adaxial (superior) e abaxial (inferior). A epiderme é contínua e única em toda extensão da folha. O mesófilo compreende todos os tecidos situados entre a epiderme e o sistema vascular da folha. O parênquima é composto por cloroplastos e pode estar diferenciado em parênquima paliçádico e parênquima esponjoso ou lacunoso. O parênquima paliçádico está localizado logo abaixo da epiderme e é constituído por células tipicamente alongadas e em forma de barras dispostas em fileiras. O parênquima esponjoso é formado por células mais arredondadas. O sistema vascular é constituído por xilema e floema. (NULTSCH, 2000). O xilema conduz a água e os sais minerais e o floema conduz compostos orgânicos sintetizados na fotossíntese.

A função primária da folha é realizar a fotossíntese, que é um processo em que a planta acumula energia a partir da luz. Durante a fotossíntese a planta utiliza a energia solar para oxidar a água – desta forma liberando oxigênio – e para reduzir o dióxido de carbono – formando grandes compostos carbonados, sobretudo açúcares. (TAIZ; ZEIGER 2009).

### **3.1.3 Composição e Propriedades Bioativas**

Moléculas produzidas pelo metabolismo dos vegetais podem ser divididas em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários ou macromoléculas, como são também denominados. Nesse grupo estão incluídos os lipídeos, as proteínas e os glicídios, com funções vitais bem definidas. Os produtos do metabolismo primário, através de rotas sintéticas diversas e frequentemente desconhecidas, originam, às custas de energia, o segundo grupo de compostos químicos – os metabólitos secundários – que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, apresentam marcantes atividades biológicas e, diferentemente daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinado grupo de plantas. (COWAN, 1999).

O interesse na utilização da química e da bioquímica em sistemática vegetal tem aumentado rapidamente nos últimos anos, principalmente, devido ao desenvolvimento de métodos analíticos aprimorados que possibilitaram a análise de um grande número de plantas com maior rapidez e relativa facilidade. (FRALEY et al., 1983).

Existem diversos estudos publicados que relatam ações da infusão preparada com folhas de *Ilex paraguariensis*, denominado chá mate, como hipocolesterolêmico, hepatoprotetivo, estimulante do sistema nervoso central, diurético e antioxidante (Tabela 1). (BRAVO et al., 2014; GAO et al., 2013; BALZAN et al., 2013; BARG et al., 2014; ARÇARI et al., 2011). Apresenta benefícios ao sistema cardiovascular, e é um protetor de oxidação do DNA *in vitro* e da lipoperoxidação de lipoproteínas de baixa densidade. (BARG et al., 2014; BRAVO et al., 2014; BALZAN et al., 2013). Alguns estudos também têm sugerido seu potencial no tratamento da obesidade (PIMENTEL et al., 2013; PANG et al., 2008).

Tabela 1. Ações relacionadas ao consumo da *Ilex paraguariensis* de formas variadas e respectivos estudos que apresentam relação com a ação.

<b>AÇÕES RELACIONADAS A:</b>	<b>ESTUDOS</b>
Radiação ultravioleta	BARG et al. (2014)
Efeitos hipocolesterolêmicos, antioxidantes, relacionados a função endotelial e na expressão do gene receptor de lipoproteína no fígado relacionados à alimentação rica em colesterol	BRAVO et al. (2014); GAO et al. (2013a); BALZAN et al. (2013) GAO et al. (2013b); ARÇARI et al. (2011); DA SILVA et al. (2008)
Diabetes, pré-diabetes e níveis de glicose sanguínea	BOAVENTURA et al. (2013); PEREIRA et al. (2012); SILVA et al. (2011)
Tratamento da sepse	DARTORA et al. (2013)
Adipogênese; atenuante dos efeitos inflamatórios centrais e peritonias	AÇARI et al. (2013); PIMENTEL et al. (2013); DE RESENDE et al. (2012); SILVA et al. (2011); PANG et al. (2008)
Prevenção da lesão hepática induzida por etanol	TAMURA et al. (2013)
Aumento da densidade mineral óssea de mulheres na pós-menopausa	CONFORTI et al. (2012)
Síndrome metabólica	HUSSEIN et al. (2011)
Inibição da proliferação de células cancerígenas no colo	DE MEJÍA et al. (2010)
Efeito cardioprotetor	SCHINELLA et al. (2009)
Melhora do aprendizado e memória	PREDIGER et al. (2008)

Numerosos fitoquímicos ativos foram identificados no chá mate, os quais podem ser responsáveis pelos seus benefícios à saúde. Dentre eles, os dois compostos mais estudados são os polifenóis e as xantinas, seguidos pelos alcaloides de purina, flavonoides, aminoácidos, minerais e vitaminas. (MURAKAMI et al., 2013).

O chá mate é muito utilizado na medicina popular por estar relacionado a efeitos benéficos ao homem, tais como ação anti-inflamatória, anti-obesidade, anti-câncer, e principalmente atividade antioxidante. Essa ação está associada aos compostos biológicos ativos produzidos pela planta. (HECK; MEJIA, 2007; BRAVO et al., 2007; BASTOS et al., 2006; MURAKAMI et al., 2013), principalmente fenóis, ácido clorogênico, metilxantinas, cafeína, teobromina, saponinas, taninos e clorofila (Tabela 2).

Tabela 2. Média da composição química de Extrato de Erva Mate (MURAKAMI et al., 2013).

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades</b>
Fenólicos totais	2.32 ± 0.003 mg equivalente de ácido Gálico/mL
Ácido Clorogênico	1862 ± 3.49 µg/mL
Cafeína	1253 ± 72.5 µg/mL
Teobromina	53.1 ± 1.44 µg/mL
Conteúdo total de saponinas	173 ± 5.14 µg/mL
Conteúdo de taninos condensados	12.8 ± 0.74 g Ácido Tânico/100g extrato seco
Conteúdo total de clorofila	11.2 ± 0.31 µg/mL

## 3.2 Proteínas

### 3.2.1 Definição

Proteínas são macromoléculas, constituídas por uma ou mais cadeias de resíduos aminoácidos. As proteínas desempenham um conjunto variado de funções no organismo, entre as quais a catalisação de reações metabólicas através das enzimas, a replicação de DNA, a resposta a estímulos e o transporte de moléculas



de um local para outro, entre outras. (NELSON; COX, 2011). As proteínas diferem entre si fundamentalmente na sua sequência de aminoácidos, a qual é determinada pela sua sequência genética, e que geralmente provoca o enovelamento da proteína numa estrutura tridimensional específica que determina a sua atividade. (HERMANN, 1995).

Tal como outras macromoléculas biológicas, como os polissacarídeos e os ácidos nucleicos, as proteínas são componentes essenciais dos organismos e participam em praticamente todos os processos celulares. Elas são nutrientes essenciais ao crescimento e manutenção da vida, sendo o principal componente estrutural de todas as células. (SANKARANARAYANAN, 2001).

### **3.2.2 Proteínas foliares**

As principais proteínas foliares são cloroplásticas e outras são proteínas solúveis do estroma. As membranas dos cloroplastos são constituídas de aproximadamente 50% de proteínas e 50% de lipídios. As principais proteínas das lamelas cloroplásticas são os complexos proteínas-clorofila, que asseguram a captura e a transferência dos fótons; os centros fotoquímicos onde acontecem as reações primárias da fotossíntese; as cadeias de transferência de elétrons, que produzem um gradiente de pH entre os dois lados das lamelas e, finalmente, as ATPases, que a partir dos gradientes de pH sintetizam o ATP. (LE GUERROUÉ, 1996).

O estroma que cerca as lamelas dos cloroplastos é um gel proteico com concentração aproximada de 300 g/L de proteínas. As proteínas enzimáticas mais típicas dos cloroplastos catalisam a fixação fotossintética do dióxido de carbono pela reação de Calvin. A enzima responsável pela carboxilação é a rubisco, presente no estroma. Essa enzima apresenta numerosas características notáveis, principalmente a baixa atividade enzimática em relação à outras enzimas do ciclo de Calvin. O equilíbrio cinético é mantido por um teor muito alto de rubisco, que pode representar 80% das proteínas do estroma. (ELLIS, 1979).

A extratabilidade, solubilidade e valor nutricional das proteínas das folhas vêm sendo estudadas (SARKAR; SIL, 2011), e o uso de concentrados proteicos das folhas como complemento alimentar afim de proporcionar proteína adicional na dieta já vêm sendo sugerido. (DALE et al., 2009). Além disso, as proteínas de baixo peso

molecular isoladas das plantas também vêm mostrando eficiência para o tratamento de diversas doenças (CHEN, MURAMOTO, YAMAUCHI et al., 1996).

### **3.3 Atividade Antioxidante**

#### **3.3.1 Radicais livres e o estresse oxidativo**

Os radicais livres são definidos como moléculas orgânicas ou inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, cuja configuração torna as moléculas instáveis e quimicamente muito reativas. A presença de radicais livres é crítica para muitas das funções fisiológicas e bioquímicas normais do organismo humano. Como exemplo de radicais livres, formados em todas as células aeróbias, podem ser citados espécies reativas de oxigênio, íon superóxido, radical hidroxila, óxido nítrico, tiol, radicais de nitrogênio, fenildiazina e radicais de enxofre. (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, podendo ser gerados no citoplasma, mitocôndrias e membranas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Na natureza, o oxigênio forma espécies reativas capazes de causar lesão celular, cuja concentração em condições normais é extremamente baixa, em função do efetivo controle de enzimas e nutrientes antioxidantes que removem e/ou impedem sua formação. (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O estresse oxidativo pode ser caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação e a remoção de radicais livres de um organismo, decorrente do aumento da geração desses ou da diminuição dos antioxidantes endógenos. (FOYER; SHIGEOKA, 2011).

As lesões causadas pelo processo oxidativo *in vivo*, induzidas por radicais livres, devem ser removidas das macromoléculas pelos sistemas de reparo, para evitar alterações das funções celulares. Além da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e, conseqüentemente, o aumento do risco para a aterosclerose, tais alterações estão associadas a várias condições clínicas, como lesão das fibras cardíacas, iniciação e progressão da carcinogênese, inflamações crônicas, diabetes, doenças auto-imunes e o processo de envelhecimento, devido ao acúmulo ao longo

do tempo. (BRAVO et al., 2014; ARÇARI et al., 2011). Os danos induzidos pelo estresse oxidativo nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças. Portanto é crescente o interesse em tratamentos que visem a redução do estresse oxidativo, principalmente através dos alimentos ricos em antioxidantes (BALZAN et al., 2013 & HUSSEIN et al., 2011).

### **3.3.2 Ação antioxidante de proteínas e peptídeos**

A busca por novos componentes naturais com possível ação antioxidante tem sido investigada, entre eles os peptídeos e aminoácidos, tanto de origem animal quanto vegetal. (ZHU et al., 2008). Nos últimos anos uma vasta evidência científica vem prevendo a existência de peptídeos biologicamente ativos e proteínas derivadas de alimentos que podem ter efeitos benéficos sobre a saúde humana. Peptídeos bioativos e proteínas são adquiridos a partir de diversas fontes animais e de plantas. (MOLLER et al, 2008).

Peptídeos e aminoácidos antioxidantes são considerados substâncias bioativas, ou seja, são componentes presentes nos alimentos, capazes de interferir no metabolismo ou em processos fisiológicos do organismo causando um impacto positivo na saúde do indivíduo. (MÖLLER et al., 2008). Estas substâncias bioativas podem atuar como antihipertensivos, antioxidantes, antitrombóticos, anticarcinogênicos, opioides e imunomoduladores. (KITTS; WEILER, 2003; MÖLLER et al., 2008). Dentre estas funções, a capacidade antioxidante é uma das que tem sido amplamente estudada. (LI et al., 2008; TANG et al., 2009; ARCAN; YEMENICIOGLU, 2010; ORSINI DELGADO et al., 2011).

Recentemente, a utilização de proteínas purificadas ou extratos naturais de proteínas como antioxidantes tem atraído particular interesse. Muitas proteínas alimentares, incluindo proteínas do leite, soja, cogumelo, ovo, milho, batata e inhame, foram relatadas como apresentando atividade antioxidante. (CHIUE et al, 1997; SATUE-GRACIA et al, 2000; ZHAO et al., 2004). Além da sua atividade de eliminação de radicais livres, as proteínas podem evitar a oxidação lipídica isolando lipídios a partir de radicais livres e íons metálicos. (ARCAN; YEMENICIOGLU, 2007).

ALASHI et al. (2014), SAIDI et al. (2014), GIRGIH et al. (2013) e AHN et al. (2014) foram alguns dos pesquisadores que analisaram a atividade antioxidante de

hidrolisados proteicos mostrando o potencial que essas proteínas têm para serem utilizadas como ingredientes bioativos na formulação de alimentos funcionais contra o estresse oxidativo, formulação de produtos nutricionais, aumento da vida de prateleira dos produtos, entre outras.

A atividade antioxidante de hidrolisados proteicos está relacionada à composição e sequência dos aminoácidos e com o tamanho e a estrutura tridimensional do peptídeo. (PEÑA-RAMOS et al., 2004). A capacidade antioxidante dos peptídeos em relação à proteína de origem e aos aminoácidos deve-se à relação entre as propriedades químicas, físicas e na composição química do peptídeo. (ELIAS et al., 2008). Frente aos relatos científicos da atividade antioxidante das proteínas e a necessidade de combater os radicais livres, torna-se importante o estudo desta ação e a investigação de mais fontes de compostos bioativos antioxidantes, visto que podem ser utilizados de forma funcional na indústria de alimentos e farmacêutica.

### **3.3.3 Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos ou polifenóis pertencem ao grupo de substâncias fitoquímicas que inclui uma grande diversidade de estruturas químicas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxilas. Eles estão distribuídos no reino vegetal, no metabolismo de animais e nos microrganismos. Dentre os compostos fenólicos presentes nos vegetais são encontrados: ácidos fenólicos, cumarinas, ligninas, taninos, flavonoides e fazendo parte de alcaloides e terpenoides. Os compostos fenólicos contribuem para a coloração de vegetais e estão relacionados com a qualidade sensorial dos alimentos (MURAKAMI et al., 2013).

Os polifenóis têm apresentado grande interesse nutricional por sua contribuição na manutenção da saúde humana. Além dos bem conhecidos betacaroteno, vitamina C e vitamina E, estudos têm demonstrado a importância de outros compostos antioxidantes na capacidade antioxidante dos vegetais. Assim, muitas propriedades funcionais dos alimentos de origem vegetal estão sendo estudadas e descritas mostrando a relação de frutos, folhas e sementes e a atividade

antioxidante relacionada ao teor de compostos fenólicos totais (CHANDRAS & MEJIA, 2004; ZIELINSKI, 2014).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 *Ilex paraguariensis***

As folhas de *Ilex paraguariensis* foram coletadas na sede do Instituto Brasileiro da Erva Mate (Coordenadas: 28°55'43.5"S 52°15'47.9"W; 680m), localizado na cidade de Ilópolis (Rio Grande do Sul). As coletas foram realizadas no inverno, no período de agosto a outubro de 2014. O material vegetal foi coletado com tesoura de poda e transportado a 10°C ao Laboratório de Bioquímica do Itt Nutrifor. Em seguida as folhas foram selecionadas, higienizadas três vezes em água corrente e em seguida, submersas em solução a 2% de hipoclorito de sódio, por 5 minutos. Após, o material vegetal foi lavado em água deionizada e enxaguado com água ultrapura. As folhas higienizadas foram armazenadas a -20°C, até sua utilização.

### **4.2 Aquisição dos produtos químicos e reagentes**

Todos os produtos químicos e reagentes são de grau analítico e adquiridos a partir de fontes comerciais.

### **4.3 Obtenção do extrato bruto**

Para obtenção do Extrato Bruto (EB), as folhas foram homogeneizadas com tampão de extração [Trisaminometano Hidroclorido (Tris HCl) 50 mM, pH 8, Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 1 mM, Ditiotreitól (DTT) 0,5 mM, 5% de Glicerol e 0,1% de Triton X100] a 4°C. O homogenato foi filtrado em gaze dobrada, e em seguida centrifugado a 5000 x g por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado a 4°C.

### **4.4 Obtenção das frações proteicas**

O extrato obtido na etapa anterior foi fracionado através da precipitação com sulfato de amônio nos seguintes intervalos de saturação: Fração I (FI) 0-20%, Fração II (FII) 20-50%, Fração III (FIII) 50-100% e Fração Total (FT) 0-100%. Após a

centrifugação de cada etapa, o precipitado foi dissolvido em 200 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM, 5% de Glicerol e 0,1% de Triton X100 e dializado em membranas de ultrafiltração (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units-Millipore*) com limite de exclusão de 3 kDa em tampão Tris HCl 10 mM pH 7,2 para a retirada do sulfato de amônio. Após a diálise, foram adicionados 8 mL de tampão Tris HCl 10 mM pH 7,2 às amostras.

Para o isolamento das proteínas da Fração III, utilizou-se membrana de ultrafiltração (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units-Millipore*) com o limite de exclusão de 50kDa. As duas frações, retida [Fração III  $\leq$  50kDa (FIII A)] e ultrafiltrada [Fração III  $\geq$  50kDa (FIII B)], foram lavadas com mais 80 mL de tampão Tris HCl 50 mM, pH 8, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM, 5% de Glicerol e 0,1% de Triton X100, seguida por lavagem com 30 mL de tampão Tris HCl 10 mM pH 7,2, e adicionadas em 2 mL de tampão Tris HCl 10 mM pH 7,2 e, após, armazenadas a -20°C.

#### **4.5 Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas do extrato e das frações foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como proteína padrão.

#### **4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada utilizando mini geis NuPAGE Bis-Tris (NOVEX<sup>®</sup> Life Technologies). À uma alíquota de 13  $\mu$ L de cada amostra, na concentração de 3 mg/mL de proteínas, foram acrescentados 5  $\mu$ L de tampão de amostra LDS (Lithium Dodecil Sulfato) NuPAGE e 2  $\mu$ L de Agente de Redução NuPAGE (ambos da NOVEX<sup>®</sup> Life Technologies). As amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos. O marcador de peso molecular utilizado foi o See Blue Pre-Stained Standard (NOVEX<sup>®</sup> Life Technologies). Em seguida, 20  $\mu$ L de cada amostra e do marcador foram aplicados no gel. O tampão de migração utilizado foi o MES ([2- (N-morfolino) etano sulfônico]) (NOVEX<sup>®</sup> Life Technologies). A migração foi realizada com a voltagem de 200 Volts durante 35 minutos. Os geis foram corados com comassie blue utilizando o reagente SimplyBlue Safe Stain (NOVEX<sup>®</sup>, Life Technologies), de acordo com especificações do fabricante.

#### **4.6.1 Fotodocumentação**

As imagens dos geis foram registradas através do fotodocumentador *Syngene PXi* utilizando o programa GeneSys, Versão 1.4.1.0.

#### **4.7 Compostos fenólicos solúveis totais**

A concentração de Compostos Fenólicos Solúveis Totais (CFST) foi avaliada conforme descrito por Singleton; Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), Walter (2009) e Walter et al. (2013) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Uma alíquota de 80 µL de extrato foi diluída com 2000 µL de água destilada, adicionando-se 200 µL de reagente Folin-Ciocalteu 0,25 N. Após esse procedimento, aguardou-se 3 minutos antes de adicionar 1000 µL de carbonato de sódio 7,5%. A mistura de reação foi incubada por 2 h a 23°C, no escuro, para completar a reação. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (SpectraMax M5 Molecular Device) a 765 nm. Para o branco, foram utilizados os mesmos reagentes, porém utilizando Tampão Tris HCl 10 mM pH 7,2 ao invés de amostra. Para o cálculo da quantidade de compostos fenólicos, uma curva padrão de ácido gálico foi construída e substituiu-se o valor da absorbância no y na equação da reta encontrando a quantidade em mg de ácido gálico por mL de amostra. As amostras foram utilizadas todas na concentração de 0,5 mg/mL de proteína.

#### **4.8 Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante (AAO) foi avaliada através da atividade sequestrante do radical DPPH (1, 1-Difenil-2-picrilhidrazil) conforme descrito por Brand-Williams, Cuvelier; Berset (1995); Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998); Walter (2009) e Walter et al. (2013).



#### 4.8.1 Cinética de sequestro do radical DPPH

Para a cinética de sequestro do radical DPPH, 175 µL de cada amostra foram combinados com 3325 µL de solução de DPPH 0,06 mM. A mistura de reação foi monitorada por 30 minutos a 23°C com leituras de absorvância de 30 em 30 segundos, no escuro. A redução do radical de DPPH foi medida pelo monitoramento do decréscimo da absorção a 515 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M5 Molecular Device) em cubeta de quartzo. Através desta cinética foi avaliada a quantidade de DPPH remanescente (% DPPHR) e a capacidade antioxidante foi expressa como % DPPHR nos tempos de 2,5 minutos e 30 minutos.

#### 4.8.2 Atividade antioxidante por equivalente de Trolox

Para a atividade antioxidante por equivalente de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), 100 µL de cada amostra foram combinados com 3,9 mL de solução de DPPH 0,06 mM. A mistura de reação foi incubada por 30 minutos a 23°C e, após, lida em espectrofotômetro a 515 nm. Para o cálculo da atividade antioxidante por equivalente de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), uma curva padrão de Trolox foi construída. As concentrações de utilizadas de padrao Trolox para a construção da curva variaram de 50 a 1000 µM. Substituiu-se o valor da absorbância no y na equação da reta encontrando a quantidade de equivalente de Trolox por mL de amostra.

#### 4.9 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi processada com o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22 para Windows.

Os testes estatísticos utilizados para avaliar a significância dos resultados foram o Teste T de Student para uma amostra, o Teste T de Student para amostras pareadas e a ANOVA para amostras independentes, seguida dos testes de comparações múltiplas Tukey HSD, nos casos em que as ANOVAS foram significativas.

A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias, condições necessárias para a aplicação do Teste T de Student e da ANOVA, foram testados com o Teste de Shapiro-Wilk e com o Teste de Levene, respectivamente.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Análises do extrato bruto e frações proteicas foliares da *Ilex paraguariensis***

#### **5.1.1 Obtenção do extrato bruto e frações proteicas foliares da *Ilex paraguariensis***

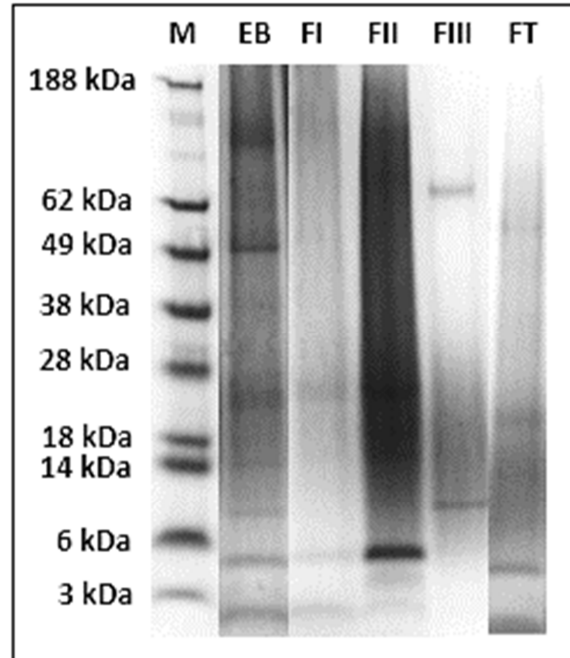
Diferentes métodos são descritos na literatura para extração de proteínas de diferentes estruturas e partes de plantas. O Tampão Tris HCl e o Tampão Fosfato Salino são dois tampões comumente utilizados (WARD e SWIATEK, 2009). Tratando-se de matriz foliar, é importante estar atento não só com a temperatura e pH que devem ser abaixo de 10°C e entre 6,0 e 8,0 respectivamente, mas também com a exclusão de metabólitos secundários e inibição de enzimas proteolíticas (HASSAN et al., 2008; BOYHAN; DANIELL, 2011; LAI et al., 2010; HUANG et al., 2005).

Nesse sentido, o tampão de extração de proteínas avaliado foi o Tris HCl 50 mM, pH 8, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM, 5% de Glicerol e 0,1% de Triton X100, conforme descrito por PINTO et al. (2013) seguido por precipitação com Sulfato de Amônio de 0 a 20%, de 20 a 50% e de 50 a 100% e ainda por lavagem em membranas de ultrafiltração com o mesmo tampão conforme descrito por ARULVASU et al. (2014) seguido por lavagem com tampão Tris HCl 10 mM pH 7,2 com o objetivo de excluir possíveis componentes interferentes nas análises de quantificação de proteínas e de atividade antioxidante das amostras. As amostras ao final de todo o processo foram ressuspensas em tampão Tris HCl 10 mM pH 7,2.

#### **5.1.2 Caracterização das bandas proteicas do extrato bruto e frações proteicas através de eletroforese (SDS-PAGE)**

A caracterização proteica das amostras realizada através de utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) estão expressos na Figura 3.

Figura 3: SDS-PAGE do Extrato Bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII) e Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*. Marcador de peso molecular See Blue Pre-Stained Standard (NOVEX® Life Technologies) (M).



Os resultados do perfil proteico foliar de *Ilex paraguariensis* obtidos a partir da eletroforese indicaram que o Extrato Bruto, a Fração I, Fração II e Fração Total apresentaram bandas entre aproximadamente 2 kDa e aproximadamente 150 kDa. Já a Fração III apresentou apenas 2 bandas predominantes de aproximadamente 10 kDa e 62 kDa.

### 5.1.3 Quantificação proteica do extrato bruto e frações proteicas através do método de Bradford

Os resultados da quantificação de proteínas apresentaram que o extrato bruto apresentou um rendimento proteico de 5,29 mg/mL, a Fração I 16,26 mg/mL, Fração II 36,47 mg/mL, Fração III 15,77 mg/mL e Fração Total 26,47 mg/mL (Tabela 3). Em relação a recuperação de proteínas, a fração que passou pela precipitação com sulfato de amônio de 20 a 50% foi a que apresentou maior concentração de proteínas, enquanto o extrato bruto que não passou pelo processo de precipitação com sulfato de amônio apresentou a menor concentração de proteínas.

Tabela 3 – Quantificação de proteínas do Extrato Bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII) e Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* pelo método de Bradford (1976).

Amostra	Concentração de Proteínas em mg/mL*
EB	5,29 <sup>a</sup> ± 0,27
FI	16,25 <sup>b</sup> ± 2,03
FII	36,47 <sup>c</sup> ± 0,92
FIII	15,77 <sup>b</sup> ± 0,52
FT	26,46 <sup>d</sup> ± 1,18

\* Dados apresentados por média ± desvio padrão  
p < 0,001

O teste ANOVA mostra que existe significância estatística na comparação entre as amostras (p < 0,001). Os testes de comparações múltiplas mostram que as diferenças apenas não são significantes entre as amostras FI e FIII.

#### 5.1.4 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato bruto e frações proteicas

Devido ao fato que os polifenóis possuem uma significativa afinidade de ligação por proteínas e o fato de KATAM et al. (2012) citarem em seu estudo o desafio de analisar o proteoma das folhas de uva devido à baixa abundância de proteínas obtidas nessas amostras, além do fato de as proteínas estarem frequentemente contaminadas com pigmentos, lipídeos e compostos fenólicos (PAPADOPOULOU e FRAZIER, 2004; KATAM et al., 2012), foi feita uma análise de polifenóis totais através do método descrito por Singleton; Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), Walter (2009) e Walter et al. (2013) utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Os resultados encontrados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4: Quantificação de polifenóis totais do Extrato Bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII), Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*.

Amostra	Polifenóis Totais * ** ***
EB	0,213 <sup>a</sup> ± 0,007
FI	0,138 <sup>b</sup> ± 0,002
FII	0,125 <sup>c</sup> ± 0,005
FIII	0,263 <sup>d</sup> ± 0,004
FT	0,175 <sup>e</sup> ± 0,003

p < 0,001

\* Dados apresentados por média ± desvio padrão

\*\* em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por mL de amostra;

\*\*\* concentração proteica: 0,5 mg/mL.

Os resultados obtidos na quantificação de polifenóis totais de *Ilex paraguariensis* mostram que o Extrato Bruto apresenta 0,213 mg EAG/mL, a Fração I 0,138 mg EAG/mL, Fração II 0,125 mg EAG/mL, Fração III 0,263 mg EAG/mL e Fração Total 0,175 mg EAG/mL.

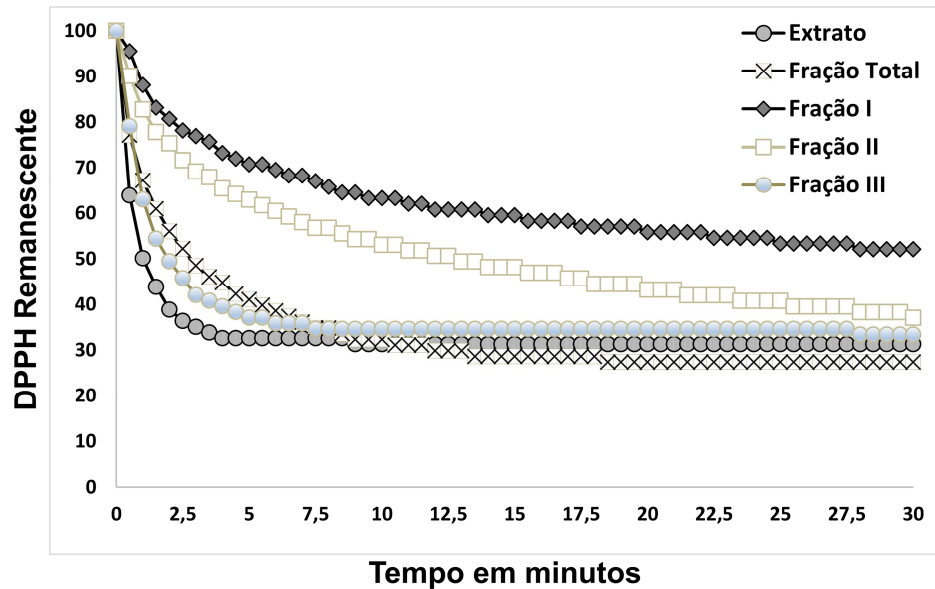
Os resultados da ANOVA (p < 0,001) mostram que existem diferenças estatisticamente significantes entre todas as amostras.

MURAKAMI et al (2013) em estudo com extrato aquoso de erva mate encontraram uma média de 2,32 mg EAG/mL de polifenóis totais. O extrato bruto e frações proteicas do presente estudo apresentam quantidades inferiores de polifenóis totais quando comparado ao extrato aquoso.

Existem várias abordagens para realizar a purificação de proteínas removendo os fenóis a partir de extratos de plantas. Um método utilizado para isto é a adição de sulfato de amônio. Neste caso, a purificação e concentração de proteína ocorre com a remoção simultânea de metabolitos secundários como os polifenóis. (FEODOR et al., 1998). Uma vez que foram realizadas precipitações com sulfato de amônio, os resultados obtidos podem estar associados a este componente.

A partir dos resultados de quantificação de proteínas e de polifenóis totais, verificou-se a capacidade antioxidante do extrato bruto e frações proteicas através do ensaio cinético de captura do radical livre DPPH (Figura 4). A partir deste ensaio, foi construída uma tabela com os valores de DPPH remanescente nos tempos 2,5 minutos e 30 minutos (Tabela 5).

Figura 4: Cinética de captura do radical livre DPPH do Extrato Bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII) e Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*<sup>a</sup>



<sup>a</sup>concentração proteica: 0,5 mg/mL.

Tabela 5: Porcentagem de DPPH remanescente do Extrato Bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII) e Fração Total (FT) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* nos tempos 2,5 minutos e 30 minutos.

Amostra	% DPPHr no tempo 2,5min*	% DPPHr no tempo 30min*	p <sup>(2)</sup>
EB	36,34 <sup>2A</sup> ± 0,02	31,33 <sup>2B</sup> ± 0,02	< 0,001
FI	78,16 <sup>2A</sup> ± 0,04	52,11 <sup>2B</sup> ± 0,06	< 0,001
FII	71,60 <sup>2A</sup> ± 0,30	37,04 <sup>2B</sup> ± 0,05	< 0,001
FIII	45,73 <sup>2A</sup> ± 0,01	33,37 <sup>2B</sup> ± 0,03	< 0,001
FT	52,24 <sup>2A</sup> ± 0,06	27,36 <sup>2B</sup> ± 0,02	< 0,001
<b>p<sup>(1)</sup></b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	

\* Dados apresentados por média ± desvio padrão

p < 0,001 no Teste T de Student para comparação com 100%;

p<sup>(1)</sup> – valor de significância da ANOVA (comparação entre amostras);

p<sup>(2)</sup> – valor de significância do Teste T de Student para amostras pareadas (comparação entre 2.5 min e 30 min).

Os resultados apresentados na Figura 4 e na Tabela 5 mostram que no tempo 2,5 minutos o do extrato bruto foliar de *Ilex paraguariensis* apresentou a menor porcentagem de DPPH remanescente. Porém, no tempo de 30 minutos, a Fração

Total foi a mais eficiente em reduzir o radical DPPH. A composição fenólica e proteica podem estar relacionadas a velocidade de captura do radical livre DPPH, uma vez que a conformação e interação dos polifenóis e das proteínas com o radical livre são diferentes entre estas substâncias (PEÑA RAMOS et al., 2004; COLLINS, 2005; ETCHEVERRY et al., 2012).

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o extrato bruto e frações, tanto na avaliação no tempo 2,5 minutos ( $p < 0,001$ ) como no tempo 30 minutos ( $p < 0,001$ ). Os valores no tempo 2,5 minutos são significativamente inferiores a 100 em todas as amostras ( $p < 0,001$ ). Observou-se uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre os valores no tempo 2,5 minutos e os valores no tempo 30 minutos.

O Trolox é um antioxidante derivado da vitamina E solúvel em água. Diversos estudos comparam a atividade antioxidante das substâncias trabalhadas com o Trolox. A atividade antioxidante por equivalente de Trolox foi realizada e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Atividade antioxidante do Extrato Bruto (EB), Fração I (FI), Fração II (FII), Fração III (FIII), e Fração Total obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* através de cálculo por equivalente de Trolox.

Amostra	Atividade Antioxidante * * * * *
EB	12,87 <sup>a</sup> ± 0,0035
FI	5,31 <sup>b</sup> ± 0,0046
FII	8,32 <sup>c</sup> ± 0,0026
FIII	16,50 <sup>d</sup> ± 0,0040
FT	13,59 <sup>e</sup> ± 0,0023

\* Dados apresentados por média ± desvio padrão;

\*\* Atividade antioxidante expressa em mM de Equivalente de Trolox por mL (mM ET/mL);

\*\*\* concentração proteica: 0,5 mg/mL;

$p < 0,001$

Os resultados obtidos com a análise de atividade antioxidante por equivalente de Trolox mostraram que o extrato bruto apresentou 12,87 mM ET/mL, a Fração I 5,31 mM ET/mL, Fração II 8,32 mM ET/mL, Fração III 16,5 mM ET/mL e Fração Total 13,59 mM ET/mL.



Os resultados obtidos pelo Extrato Bruto, Fração Total e Fração III mostraram uma atividade antioxidante superior aos extratos aquosos avaliados por CANTERLE et al. (2005), que encontraram um poder redutor entre 4,02 e 11,14 mM ET/mL para efeito seqüestrante de radicais DPPH de amostras de erva-mate provenientes do estado do RS e SC.

A comparação dos valores de Trolox entre as amostras (Tabela 6) mostrou a existência de significância estatística ( $p < 0,001$ ) nas diferenças.

Neste estudo, a amostra que mais possui compostos fenólicos (Tabela 4) em sua composição não é a amostra que possui a maior atividade antioxidante (Tabela 5 e 6).

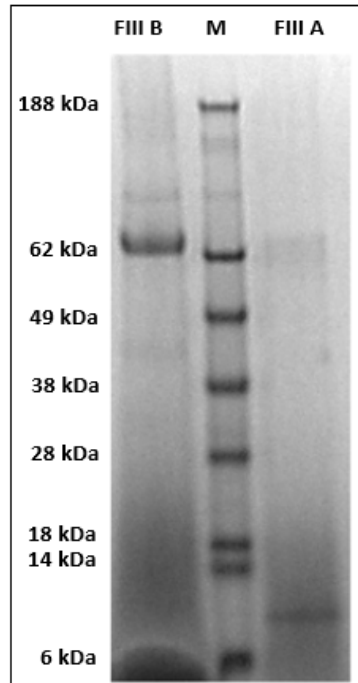
Observado a capacidade antioxidante das frações obtidas a partir do Extrato Bruto foliar de *Ilex paraguariensis*, podemos notar que a Fração III, apresentou um nível de DPPHr no tempo de 2,5 minutos e 30 minutos bastante baixo. Além disso, na figura 1 é mostrada que a Fração III apresenta apenas duas bandas de proteínas no SDS-PAGE. Dessa forma se tornou interessante investigar qual dessas frações está relacionada com a ação antioxidante. Assim, a Fração III foi submetida a uma ultrafiltração (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units-Millipore*) com o limite de exclusão de 50kDa para a separação das duas proteínas.

## **5.2 Análises das Frações proteicas foliares III, III A e III B foliares da *Ilex paraguariensis***

### **5.2.1 Caracterização das bandas proteicas das frações proteicas III A e III B através de eletroforese (SDS-PAGE)**

A caracterização proteica das amostras realizada através de utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) estão expressos na Figura 5.

Figura 5: SDS-PAGE da Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*. Marcador de peso molecular See Blue Pre-Stained Standard (NOVEX® Life Technologies) (M).



Os resultados obtidos a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida das Frações III a e III B indicaram que proteínas foram claramente separadas pelo novo fracionamento por ultrafiltração, sendo que as proteínas de peso molecular aproximado de 10 kDa pertencem à fração denominada “Fração III A” e as proteínas de peso molecular aproximado de 62 kDa pertencem à fração denominada “Fração III B” (Figura 5).

Semelhante aos pesos moleculares obtidos na Fração III A e Fração III B, KATAM et al. (2012) em seu estudo com variedades foliares de uva encontraram proteínas com peso molecular entre 12 e 100 kDa. Estes pesquisadores isolaram proteínas com peso molecular de 62 kDa e identificaram como chaperonina 60 beta e uma subunidade da rubisco. Em outro estudo, XU et al. (2006) isolaram e caracterizaram diversas proteínas foliares de soja, dentre elas uma com peso molecular de 10,5 kDa identificada como plastocianina. Esses dados são importantes para uma futura identificação das bandas proteicas das Frações III A e III B.

### 5.2.2 Quantificação proteica das frações proteicas III, III A e III B através do método de Bradford

Os resultados da quantificação de proteínas revelaram que enquanto a Fração III apresentou um rendimento proteico de 15,77 mg/mL a Fração III A apresentou 2,07 mg/mL e a Fração III B 19,49 mg/mL. Esses dados mostram que as proteínas da Fração III isoladas novamente e retidas na Fração III B são as responsáveis pela maior concentração de proteínas da Fração III (Tabela 7).

Tabela 7 – Determinação da concentração proteica da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* pelo método de Bradford (1976).

Amostra	Concentração de Proteínas em mg/mL*
FIII	15,77 <sup>a</sup> ± 0,52
FIII A	2,07 <sup>b</sup> ± 0,16
FIII B	19,49 <sup>c</sup> ± 1,47

\* Dados apresentados por média ± desvio padrão;  
p < 0,001

Os resultados da ANOVA mostram que existem diferenças estatisticamente significantes entre as amostras (p < 0,001).

### 5.2.3 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das frações proteicas III, III A e III B

Os resultados obtidos na quantificação de polifenóis totais mostram que enquanto a Fração III apresenta 0,263 mg EAG/mL, a Fração III A apresenta 0,338 mg EAG/mL e a Fração III B 0,225 mg EAG/mL. Esses dados mostram que houve uma concentração dos polifenóis totais na Fração III A e na Fração III B.

Tabela 8: Quantificação de polifenóis totais da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*.

Amostra	Polifenóis Totais * ** ***
FIII	0,263 <sup>a</sup> ± 0,004
FIII A	0,338 <sup>b</sup> ± 0,001
FIII B	0,225 <sup>c</sup> ± 0,003

\* Dados apresentados por média ± desvio padrão;

\*\* em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por mL de amostra;

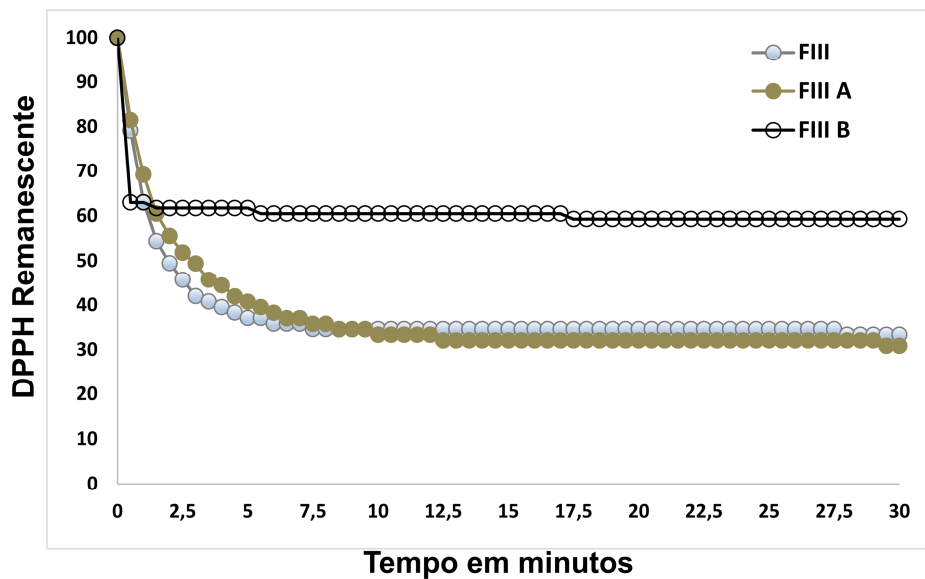
\*\*\* concentração proteica: 0,5 mg/mL;

p < 0,001

Também no casos dos polifenóis, as diferenças entre as amostras são estatisticamente significantes (p < 0,001).

A cinética da atividade antioxidante da Fração III, Fração III A e Fração III B foi avaliada com o objetivo de verificar a atividade antioxidante de cada amostra de acordo com o tempo (Figura 6). A partir deste ensaio, foi construída uma tabela com os valores de DPPH remanescente nos tempos 2,5 minutos e 30 minutos (Tabela 9).

Figura 6: Cinética de captura do radical livre DPPH da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*<sup>a</sup>



<sup>a</sup>concentração proteica: 0,5 mg/mL.

Tabela 9: Porcentagem de DPPH remanescente da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* nos tempos 2,5 minutos e 30 minutos.

Amostra	% DPPHr no tempo 2,5min*	% DPPHr no tempo 30min*	p <sup>(2)</sup>
FIII	45,73 <sup>aA</sup> ± 0,01	33,37 <sup>aB</sup> ± 0,03	< 0,001
FIII A	51,85 <sup>bA</sup> ± 0,02	30,86 <sup>bB</sup> ± 0,03	< 0,001
FIII B	61,73 <sup>cA</sup> ± 0,04	59,26 <sup>cB</sup> ± 0,02	< 0,001
p <sup>(1)</sup>	< 0,001	< 0,001	

\* Dados apresentados por média ± desvio padrão;

p < 0,001 no Teste T de Student para comparação com 100%;

p<sup>(1)</sup> – valor de significância da ANOVA (comparação entre amostras);

p<sup>(2)</sup> – valor de significância do Teste T de Student para amostras pareadas (comparação entre 2.5 min e 30 min).

Os resultados apresentados pela Figura 6 e pela Tabela 9 mostram que no tempo 2,5 minutos a menor porcentagem de DPPH remanescente é o da Fração III e a menor porcentagem de DPPH remanescente no tempo de 30 minutos é o da Fração III A. Esses dados evidenciam que a velocidade de captura do radical livre DPPH é maior quando as frações III A e III B atuam em conjunto, entretanto em um tempo de 30 minutos a Fração III A é a mais capaz de capturar o radical livre DPPH.

A comparação entre as amostras mostrou que as diferenças são estatisticamente significantes, tanto na avaliação no tempo 2,5 minutos (p < 0,001) como no tempo 30 minutos (p < 0,001). Os valores no tempo 2,5 minutos são significativamente inferiores a 100 em todas as amostras (p < 0,001). A comparação dos valores no tempo 2,5 minutos com os valores no tempo 30 minutos, mostrou que existiu uma redução estatisticamente significativa (p < 0,001).

Os resultados obtidos com a análise de atividade antioxidante por Equivalente de Trolox mostraram que enquanto a Fração III apresentou 16,5 mM ET/mL, a Fração III A apresentou 13,53 mM ET/mL e a Fração III B 17,05 mM ET/mL (Tabela 10).

Tabela 10: Atividade antioxidante da Fração III (FIII), Fração III A (FIII A) e Fração III B (FIII B) obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* através de cálculo por equivalente de Trolox.

Amostra	Atividade antioxidante * * * * *
FIII	16,50 <sup>a</sup> ± 0,0040
FIII A	13,53 <sup>b</sup> ± 0,0026
FIII B	17,05 <sup>c</sup> ± 0,0020

\* Dados apresentados por média ± desvio padrão;

\*\* Atividade antioxidante expressa em mM de Equivalente de Trolox por mL (mM ET/mL);

\*\*\* concentração proteica: 0,5 mg/mL;

p < 0,001

A comparação dos valores de Trolox entre as amostras (Tabela 10) mostrou a existência de significância estatística (p < 0,001) nas diferenças.

Neste estudo, a amostra que mais possui compostos fenólicos (Tabela 8) em sua composição é a amostra que possui a maior atividade antioxidante (Tabela 9 e 10).

A quantidade de polifenóis totais não necessariamente está relacionada à uma maior atividade antioxidante (KORUS et al., 2007). Existem diversas classes de compostos fenólicos e cada um possui uma capacidade de sequestro de radical (COLLINS, 2005; ETCHEVERRY et al., 2012).

A atividade antioxidante de proteínas está relacionada com a composição e sequência dos aminoácidos e com o tamanho e a estrutura tridimensional do peptídeo (PEÑA RAMOS et al., 2004).

Não é possível afirmar de qual ou de quais substâncias específicas dentre as proteínas e os compostos fenólicos são mais ou menos antioxidantes, mas é possível observar que todas as amostras possuem atividade antioxidante e que grande parte desta atividade pode ser atribuída ao composto proteína-polifenóis presente na Fração III A que, quando isolada, continuou a apresentar uma grande capacidade antioxidante.

## 6. CONCLUSÕES

A atividade antioxidante do extrato bruto e frações proteicas foliares de *Ilex paraguariensis* pode estar relacionada à composição formada pelo complexo proteínas-polifenóis destas amostras. O isolamento do complexo da Fração III de *Ilex paraguariensis* resultou em uma proteína com massa molecular aproximada de 10 kDa e com polifenóis totais de 0,338 mg EAG/mL. Esta fração pode ser responsável pela atividade antioxidante do extrato proteico foliar de *Ilex paraguariensis*.

## **7. PERSPECTIVAS**

Sequenciar das proteínas foliares da Fração III para identificar qual proteína está relacionada à atividade antioxidante desta fração.

Utilizar a Fração III, que contém aproximadamente 15 mg proteína/mL, como aditivo natural, de origem proteica, antioxidante em diferentes formulações de alimentos. Além disso, utilizar a mesma fração citada como base para o desenvolvimento de suplementos alimentares.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON R.E., DANIELSSON G., HEDLUND C.B, SVENSSON S.G. Effect of a heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra- high-temperature sterilized milk. **Journal Dairy Science**, v.6 p.375-379, 1981.

AHN, CB.; KIM, JG.; JE, JY. Purification and antioxidante properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysed by gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v.147, p.78-83, 2014.

ALASHI, A.M.; BLANCHARD, C.L.; MAILER, R.J.; AGBOOLA, S.O.; MAWSON, A.J.; HE, R.; GIRGIH, A.; ALUKO, R.E. Antioxidant properties of Autralian canola meal protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.146, p.500-506, 2014.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. 2. Ed. Atual. – Viçosa: Ed. UFV, p.303-326, 2006..

ARÇARI, D.P., SANTOS, J.C., GAMBERO, A., RIBEIRO, M.L. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, v.141, p.809-815, 2013.

ARÇARI, D.P., PORTO, V.B., RODRIGUES, E.R.V., MARTINS, F., DE LIMA, R.J., SAWAYA, A.C.H.F., RIBEIRO, M.L., CARVALHO, P.O. Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) supplementation on oxidative stress biomarkers and LDL oxidisability in normo- and hyperlipidaemic humans. **Journal of functional foods**, v.3, p.190-197, 2011.

ARCAN, I.; YEMENICIOGLU, A. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. **Food Research International**, v.43, n.1, p.140-147, 2010.

ARULVASU, C., SHAKTHI, S.K.S., BABU, G., RADHAKRISHNAN, N. Purification and identification of bioactive protein from leaves of *Datura inoxia* P.mil. **Biomedicine & Preventve Nutrition**, 2014.

BANSAL, S., CHOUDHARY, S., SHARMA, M., KUMAR, S.S., LOHAN, S., BHARDWAJ, V., SYAN, N. JYOTI, S. Tea: a native source of antimicrobial agents. **Food Research International**, v.53, p.568-584, 2013.

BALZAN, S., HERNANDES, A., REICHERT, C.L., DONADUZZI, C., PIRES, V.A., JUNIOR, A.G., JUNIOR, E.L.C. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v.86, p.115-122, 2013.

BARG, M., REZIN, G.T., LEFFA, D.D., BALBINOT, F., GOMES, L.M., CARVALHO-SILVA, M., VUOLO, F., PETRONILHO, F., DAL-PIZZOL, F., STRECK, E.L., ANDRADE, V.M. Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on the prevenion of oxidative damage caused by

ultravioleta radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.37, p.195-201, 2014.

BASTOS, D.H.M., FORNARI, A.C., QUEIROZ, Y.S., TORRES, E.A.F.S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex Paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, no3, 2006.

BERTUCCI, A., OLIVARO, C., SILVA, P.A., RAMOS, D., CERDEIRAS, M.P., VÁRQUEZ, A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the Riverside forests of the Southern Uruguay River. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.20-25, 2009.

BIANCHI, M.L.P., ANTUNES, L.M.G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista Nutrição**, v. 12 (2), p.123-130, 1999.

BOAVENTURA, B.C.B., DI PIETRO, P.F., KLEIN, G.A., STEFANUTO, A., DE MORAIS, C., DE ANDRADE, F., WAZLAWIK, E., DA SILVA, E.L. Antioxidante potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v.5, p.1057-1064, 2013.

BOAVENTURA, B.C.B., DI PIETRO, P.F., STEFANUTO, A., KLEIN, G.A., DE MORAIS, E.C., DE ANDRADE, F., WAZLAWIK, E., DA SILVA, E.L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v.28, p.657-664, 2012.

BRACESCO, N., SANCHEZ, A.G., CONTRERAS, V., MENINI, T., GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.378-384, 2011.

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

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

BRAVO, L., GOYA, L., LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v.40, p.393-405, 2007.

BRAVO, L., MATEOS, R., SARRIÁ, B., BAEZA, G., LECUMBERRI, E., RAMOS, S., GOYA, L. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v.92, p.219-229, 2014.

BROVKO, F.A., ZAGRANICHNAYA, T.K. Separation of proteins from phenols in cereal leaf extract by hydrophobic interaction – ammonium sulfate fractionation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.36, p.773-777, 1998.

- BURRIS, K.P., DAVIDSON, P.M., STEWART Jr, C.N., HARTE, F.M. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguarensis*) aqueous extracts against Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, 2011.
- CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Peptide sequencing using mass spectrometry: a practical guide. **Química Nova**, v.31, n.3, 2008.
- CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.R. Erva-mate e atividade antioxidante. **Universidade Federal de Santa Maria – Centro de Ciências Rurais**, 2005.
- CHANDRAS, S.; MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and reductase activity of a aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p.3583-3589, 2004.
- CHEBOLU, S., DANIELL, H. Stable expression. Of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. **Plant Biotechnology Journal**, v.5(2), p.230-239, 2007.
- CHEN, H.-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2619-2623, 1996
- CHIUE, H., KUSANO, T., & IWAMI, K. Deamidation-induced fragmentation of maize zein, and its linked reduction in fatty acid binding capacity as well as antioxidative effect. **Food Chemistry**, v.58, p.111–117, 1997.
- COLLINS, A.R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, n.1, p.261-267, 2005.
- CONFORTI, A.S., GALLO, M.E., SAVARÍ, F.D. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. **Bone**, v.50, p.9-13, 2012.
- COUTINHO, H.D.M., COSTA, J.G.M., SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P., LIMA, E.O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant Staphylococcus aureus- MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.670-675, 2008.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology**, v.12, no 4, p.564-582, 1999.
- DALE, B.E., ALLEN, M.S., LASER, M., LYND, L.R. Protein feeds coproduction in biomass conversion to fuels and chemicals. **Biofuels, Bioproducts, & Biorefining**, v.3, p.219-230, 2009.

DANIELL, H., SINGH, N.D., MASON, H., STREATFIELD, S.J. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. **Trends Plant Science**, v.14, p.669-679, 2009.

DA SILVA, E.L., NEIVA, T.J.C., SHIRAI, M. TERAQ, J., ABDALLA, D.S.P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research**, v.41, p.973-979, 2008.

DARTORA, N., DE SOUZA, L.M., PAIVA, S.M.M., SCOPARO, C.T., LACOMINI, M., GORIN, P.A.J., RATTMANN, Y.D., SASSAKI, G.L. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvante in sepsis treatment. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p.1776-1782, 2013.

DE MEJÍA, E.G., SONG, Y.S., HECK, C.I., RAMÍREZ-MARES, MV. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant, capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v.2, p.23-34, 2010.

DE RESENDE, P.E., VERZA, S.G., KAISER, S., GOMES, L.F., KUCHARSKI, L.C., ORTEGA, G.G. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, p.735-740, 2012.

DUFRENNE J, BIJWAARD M, GIFFEL M, BEUMER R, NOTERMANS S. Characteristics of some psychrotrophics *Bacillus cereus* isolates. **International Journal Food Microbiology**, v.27, p.175-183, 1995.

DUTHIE, G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, J.A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutritional Research Reviews**, v.13, p.79-106, 2000.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, n.5, p.430-441,, 2008.

ELLIS, R.J. The most abundant protein in the world. **North-Holland Biomedical Press**, 1979.

ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M.A.; FLEIGE, L.E. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in Physiology**, v.3, n.317, p.1-22, 2012.

FENG, WJ., GUO, BJ., YAO, YY., PENG, HR., SUN, QX., NI, ZF. Proteomic identification of rhythmic proteins in maize seedling leaves. **Journal of Integrative Agriculture**, v.11(12), p.1958-1967, 2012.

FILIP, R., SEBASTIAN, T., FERRARO, G., ANESINI, C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.649-655, 2007.

FIRMO, W.C.A., MENEZES, V.J.M., PASSOS, C.E.C., DIAS, C.N., ALVES, L.P.L., DIAS, I.C.L., NETO, M.S., OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e

concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, São Luís, v.18, no especial, 2011.

FOYER, C.H., SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155 no. 1, p.93-100, 2011.

FRALEY, R.T., ROGERS, S.G., HORSCH, R.B., SANDERS P.R., FLICK, J.S., ADAMS, S.P., BITTNER, M.L., BRAND, L.A., FINK, C.L., FRY, J.S., GALLUPPI, G.R., GOLDBERG, S.B., HOFFMANN, N.L., WOO, S.C. Expression of bacterial genes in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.80, n.15, p.4803-4807, 1983.

GAO, H., LONG, Y., JIANG, X., LIU, Z., WANG, D., ZHAO, Y., LI, D., SUN, B. Beneficial effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. **Experimental Gerontology**, v.48, p.572-578, 2013a.

GAO, H., LIU, Z., QU, X., ZHAO, Y. Effects of yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression. In hyperlipidemic rats. **Fitoterapia**, v.84, p.264-272, 2013b.

GECHELE, E., SCHILLBERG, S., MERLIN, M., PEZZOTTI, M., AVESANI, L. A downstream process allowing the efficient isolation of a recombinant amphiphilic protein from tobacco leaves. **Journal of Chromatography B**, v.960, p.34-42, 2014.

GIRGIH, A.T.; UDENIGWE, C.C.; HASAN, F.M.; GILL, T.A.; ALUKO, R.E. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. **Food Research International**, v.52, p.315-322, 2013.

GYAWALI, R. IBRAHIM, S.A. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, n.1, p.29-45, 2012.

GYAWALI, R. IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v.46, p.412-429, 2014.

HARBONE J.N., Plant phenols, in: Bell E.A., Charlwood B.V. (Eds.), **Encyclopaedia of plant physiology**, v. 8, Springer-Verlag, Berlin, p. 329-402, 1980.

HECK, C.I., DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, 2007.

HERMANN, J. R. Protein and the Body. **Oklahoma Cooperative Extension Service, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources** - Oklahoma State University: T-3163-1 – T-3163-4, 1995.

HEY, J. POSCH, A., COHEN, A., LIU, N., HARBERS, A. Fractionation of complex protein mixtures by liquid-phase isoelectric focusing. **Methods in Molecular Biology**, v.424, p.225-239, 2008.

HO, S.T., TUNG, Y.T., CHENG, K.C., WU, J.H. Screening, determination and quantification of major antioxidants from *Balanophora laxiflora* flowers. **Food Chemistry**, v.122, p.584-588, 2010.

HOLLER, C., ZHANG, C. Purification of an acidic recombinant protein from transgenic tobacco. **Biotechnology and Bioengineering**, v.99, n.4, p.902-909, 2008.

HOLLER C, VAUGHAN D, ZHANG C. Polyethyleneimine precipitation versus anion exchange chromatography in fractionating recombinant beta-glucuronidase from transgenic tobacco extract. **Journal of Chromatography A**, v.1142, n.1, p.98-105, 2007.

HUANG, Z., ELKIN, G., MALONEY, B.J., BEUHNER, N., ARNTZEN, C.J., THANAVALA, MASON, H.S. Virus-like particle expression. And assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. **Vaccine**, v.23, p.1851-1858, 2005.

HUSSEIN, G.M.E., MATSUDA, H., NAKAMURA, S., AKIYAMA, T., TAMURA, K., YOSHIKAWA, M. Protective and ameliorative effects of mate (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. **Phytomedicine**, v.19, p.88-97, 2011.

JAMES, S.A., STRATFORD, M. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. In: Boekhout, T. and Robert, V. (Eds), Yeasts in food - Beneficial and detrimental aspects. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press, Cambridge, p.171-191, 2003.

JAY, J.M., LOESSNER, M.J., GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. Editora. Springer Verlag Pod, 7.ed., 2006.

JERVIS L., PIERPOINT W.S., Purification technologies for plant proteins. **Journal of Biotechnology**, v.14, p.161-198, 1989.

KATAM, R.; BASHA, S.M.; PARKS, C.; SAKATA, K; LATINWO, L.M. Identification and characterization of differentially expressed leaf proteins among *Vitis* species. **Annals of Applied Biology**, v.160, p.273-290, 2012.

KIM, H.J., KO, J., STORNI C., SONG, H.J., CHO, Y.G. Effect of green mate in overweight volunteers: A randomized placebo-controlled human study. **Journal of functional foods**, v.4, p.287-293, 2012.

KIM, S.J., CHO, A.R., HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v.29, p.112-120, 2013.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, n.16, p.1309, 2003.

KORUS, J.; GUMUL, D.; CZECHOWSKA, K. Effect of extrusion on the phenolic composition and antioxidant of dry beans of *Phaseolus vulgaris* L. **Bio Food Tech**, v.45, p.139-146, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAI, H., ENGLE, M., FUCHS, A., KELLER, T., JOHNSON, S., GORLATOV, S., DIAMOND M.S., CHEN, Q. Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, p.2419-2424, 2010.

LANZETTI, M., BEZERRA, F.S., ROMANA-SOUZA, B., BRANDO-LIMA, A.C., KOATZ, V.L.G., PORTO, L.C., VALENCA, S.S. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v.24, p.375-381, 2008.

LE GUERROUÉ, J.L., DOUILLARD, R., CEREDA, M.P., CHIARELLO, M.D. As proteínas da folha de mandioca: Aspectos fisiológicos, nutricionais e importância tecnológica. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamentos de Alimentos**, Curitiba, v.14, no 2, p.133-148, 1996.

LEE, D.G., PARK, K.W., NA, J.Y., SOHN, Y.G., HA, J.K., KIM, H.Y., BAE, D.W., LEE, K.H., KANG, N.J., LEE, B.H., KANG, K.Y., LEE, J.J. Proteomics analysis of salt-induced leaf proteins in two rice germplasms with different salt sensitivity. **Canadian Journal of Plant Science**, v.91, p.337-349, 2011.

LI, Y.; JIANG, B.; ZHANG, T.; MU, W.; LIU, J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). **Food Chemistry**, v.106, n.2, p.444- 450, 2008.

LU, Y., QI, Y.X., ZHANG, H., ZHANG, H.Q., PU, J.J., XIE, Y.X. Separation and identification of *Musa acuminata* Colla (banana) leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Genetics and Molecular Research**, v.12(4), , 2013.

MARIA-FERREIRA, D., DARTORA, N., DA SILVA, L.M., PEREIRA, I.T., DE SOUZA, L.M., RITTER, D.S., IACOMINI, M., WERNER, M.F.P., SASSAKI, G.L., BAGGIO, C.H. Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguayensis* A. St.-Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.59, 2013.

MARTIN, J.G.P., PORTO, E., DE ALENCAR, S.M., D GLÓRIA, E.M., CORRÊA, C.B., CABRAL, I.S.R. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina de Microbiología**, v.45(2), p.93-98, 2013.

MICHELIN, D.C., SANNOMIYA, M., FIGUEIREDO, M.E., RINALDO, D., SANTOS, L.C., SOUZA-BRITO, A.R.M., VILEGAS, W., SALGADO, H.R.N. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.690-695, 2008.

MÖLLER, N.; SCHOLZ-AHRENS, K.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v.47, n.4, p.171-182, 2008.

MOREIRA, A.C., MULLER, A.C.A., PEREIRA JR, N., ANTUNES, A.M.S. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: Policy, law and statistics. **World Patent Information**, v.28, p.34–42, 2006.

MURAKAMI, A.N.N., AMBONI, R.D.M.C., PRUDÊNCIO, E.S., AMANTE, E.R., FRITZEN-FREIRE, C.B., BOAVENTURA, B.C.B., MUÑOZ, I.B., BRANCO, C.S., SALVADOR, M., MARASCHIN, M. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v.141, p.60-65, 2013.

NAGARATHNAM, R.; RENGASAMY, A.; BALASUBRAMANIAN, R. Purification and properties of cysteine protease from rhizomes of *Curcuma longa* (Linn.). **Journal of Science Food Agriculture**, v.90, p.97-105, 2010.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Ed. Artmed, 5ª ed., 2011.

NULTSCH, W. **Botânica geral**. 10. Ed. Revisada e atualizada – Porto Alegre: Ed. Artes Médicas Sul, p.190-202, 2000.

OBEMBE, O.O., POPOOLA, J.O., LEELAVATHI, S., REDDY, S.V. Advances in plant molecular farming. **Biotechnology Advances**, v.29, p.210-222, 2011.

Observatório de Relações Internacionais. Disponível em:

<http://necint.wordpress.com/direito-internacional/arena-de-ideias/mercosul/o-brasil-na-america-latina-mercosul/>, acesso em 10/09/2013.

OEY, M., LOHSE, M., KREIKEMEYER, B., BOCK, R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression. Of a highly stable protein antibiotic. **Plant Journal**, v.57, p.436-445, 2009.

OH, J., JO, H., CHO, A.R., KIM, S.J., HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, v.31, p.403-409, 2013.

OLIVEIRA, D.M., FREITAS H.S., SOUZA, M.F.F., ARÇARI, D.P., RIBEIRO, M.L., CARVALHO, P.O., BASTOS, D.D.M. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extract Decreases Intestinal SGLT1 Gene Expression But Does Not Affect Other Biochemical Parameters in Alloxan-Diabetic Wistar Rats. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, p.10527–10532, 2008.

OPLUSTIL C.P., ZOCCOLI C.M., TOBOUTI N.R., SINTO S.I. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. São Paulo: Sarvier, p. 169, 2000.



ORSINI DELGADO, M. C.; TIRONI, V. A.; AÑÓN, M. C. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. **LWT. Food Science and Technology**, v.44, n.8, p.1752-1760, 2011.

PANG, J., CHOI, Y., PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Achieves of Biochemistry and Biophysics**, v.476, p.178-185, 2008.

PAUL, M., MA, J.K.C. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v.58, p.5-67, 2011.

PECKHAM, G.D.; BUGOS, R.C.; SU, W.W. Purification of GFP fusion proteins from transgenic plant cell cultures. **Protein Expression and Purification**, v.49, n.2, p.183-189, 2006.

PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L.; ARTEAGA, G. E. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.14, p.1908-1918, 2004.

PEREIRA, D.F., KAPPEL, V.D., CAZAROLLI, L.H., BOLIGON, A.A., ATHAYDE, M.L., GUESSER, S.M., DA SILVA, E.L., SILVA, F.R.M.B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v.19, p.868-877, 2012.

PIMENTEL, G.D., LIRA, F.S., ROSA, J.C., CARIS, A.V., PINHEIRO, F., RIBEIRO, E.B., DO NASCIMENTO, C.M.O., OYAMA, L.M. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, p. 809-818, 2013.

PREDIGER, R.D.S., FERNANDES, M.S., RIAL, D., WOPEREIS, S., PEREIRA, V.S., BOSSE, T.S., DA SILVA, C.B., CARRADORE, R.S., MACHADO, M.S., CECHINEL-FILHO, V., COSTA-CAMPOS, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.465-473, 2008.

PUANGPRAPHANT, S., BERHOW, M.A., DE MEJIA, E.G. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. **Food Chemistry**, v.125, p.1171-1178, 2011.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 5. Ed. – Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p.90-109, 2000.

RUHLMAN, T., VERMA, D., SAMSON, N., DANIELL, H. The role of heerologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. **Plant Physiology**, v.152, p.2088-2104, 2010.

SAIDI, S.; DERATANI, A.; BELLEVILLE MP.; AMAR, R.B. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysed produced by membrane fractionation process. **Food Research International**, 2014.

SMITH, P.K. et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal. Biochemistry**, v.150, p. 76-86, 1985.

SANKARANARAYANAN, R., MORAS, D. The fidelity of the translation of the genetic code. **Acta Biochimica Polonica**, v.48(2), p.323-335, 2001.

SARKAR, K., SIL, P.C. *Cajanus indicus* leaf protein: Beneficial role in experimental organ pathophysiology. A review. **Pathophysiology**, v.18, p.295-303, 2011.

SATUE-GRACIA, M. T., FRANKEL, E. N., RANGAVAJHYALA, N., & GERMAN, J. B. Lactoferrin in infant formulas: Effect on oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.4984–4990, 2000.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073-2085, 2000.

SCHINELLA, G., FANTINELLI, J.C., TOURNIER, H., PRIETO, J.M., SPEGAZZINI, E., DEBENEDETTI, S., MOSCA, S.M. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Food Research International**, v.42, p.1403-1409, 2009.

SINGLETON, R.D.D.; SANTOS, K.F.N.; DIDONET, C.C.G.M.; DIDONET, A.D.; BRONDANI, C. Proteínas de reserva de acessos de coleção nuclear de arroz. Pesquisa Agropecuária Brasileira

SILVA, R.D.A., BUENO, A.L.S., GALLON, C.W., GOMES, L.F., KAISER, S., PAVEI, C., ORTEGA, G.G., KUCHARSKI, L.C., JAHN, M.P. The effect of aqueous extract of gross and comercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**, v.82, p.818-826, 2011.

SILVA JUNIOR, I.F., CECHINEL FILHO, V., ZACCHINO, S.A., LIMA, J.C.S., MARTINS, D.T.O. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.242-248, 2009.

SHARMA, A.K., SHARMA, M.K. Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v.27, p.811-832, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. Ed. – Porto Alegre: Ed. Artmed, p.147-240, 2009.

TAJKARIMI, M., IBRAHIM, S., CLIVER. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, n.9, p.1199-1218, 2010.

TANG, C.-H.; PENG, J.; ZHEN, D.-W.; CHEN, Z. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.115, n.2, p.672-678, 2009.

TAMURA, A., SASAKI, M., YAMASHITA, H., MATSUI-YUASA, I., SAKU, T., HIKIMA, T., TABUCHI, M., MUNAKATA, H., KOJIMA-YUASA, A. Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats. **Journal of Functional Foods**, v.5, p.1714-1723, 2013.

TRAN, M., ZHOU, B., PETERSON, P.L., GONZALEZ, M.J., MAYFIELD, S.P. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. **Biotechnology Bioengineering**, v.104, p.663-673, 2009.

WALTER, M.; MARCHESAN, E.; MASSONI, P.F.S.; SILVA, L.P.; SARTORI, G.M.S.; FERREIRA, R.B. Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. **Food Research International**, v.50, n. 2, p.698-703, 2013.

WARD, W.W., SWIATEK, G. Protein purification. **Current Analytical Chemistry**, v.5, p.85-105, 2009.

WILKEN L.R., NIKOLOV, Z.I. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. **Biotechnology Advances**, v.30, p.419-433, 2012.

XU, C., GARRETT, W.M., SULLIVAN, J., CAPERNA, T.J., NATARAJAN, S. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Phytochemistry**, v.67, p.2431-2440, 2006.

XU, C.; WESLEY, M.; GARRET, M.; SULLIVAN, J.; CAPERNA, T.J.; NATARAJAN, S. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Phytochemistry**, v.67, p.2431-2440, 2006.

XU, J., DOLAN, M.C., MEDRANO, G., CRAMER, C.I., WEATHERS, P.J. Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1171-1184, 2012.

ZENGIN, G., AKTUMSEK, A., GULER, G.O., CAKMAK, Y.S., GIRÓN-CALLE, J., ALAIZ, M., VIOQUE, J. Nutritional quality of protein in the leaves of eleven Asphodeline species (*Liliaceae*) from Turkey. **Food Chemistry**, v.135, p.1360-1364, 2012.

ZIELINSKI, A.A.F., HAMINIUK, C.W.I., ALBERTI, A., NOGUEIRA, A., DEMIATE, I.M., GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v.60, p. 246-254, 2014.

ZHAO, L., ZHAO, G., HUI, B., ZHAO, Z., TONG, J., & HU, X. Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of protein extracts from a selenium-enriched mushroom species of the *Genoderma* Genus. **Journal of Food Science**, v.69, p.184–188, 2004.

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.8, p.2714-2721, 2008.