

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA COMPARATIVA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS PARTES AÉREAS E DE CULTURA
DE CALOS DE *Cereus peruvianus* Mill. (CACTACEAE)

LEONARDO YUGO ABE TANAKA

Orientador: Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves.

Maringá

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA COMPARATIVA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS PARTES AÉREAS E DE CULTURA
DE CALOS DE *Cereus peruvianus* Mill. (CACTACEAE)

LEONARDO YUGO ABE TANAKA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Maringá

2010

Dedico esse trabalho a minha mãe Clara.

Por ter me apoiado durante os bons e difíceis momentos que vivenciei.

Sempre com amor, carinho e compreensão.

Uma batalhadora no qual me inspiro.

Uma pessoa que nunca conhecerei igual.

Saudades eternas de ti.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Arildo José Braz de Oliveira pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança em aceitar me orientar mesmo indo realizar o seu Pós-Doutorado. Pelo grande aprendizado e pela amizade que são importantes não só para a conclusão do mestrado, mas para toda a minha vida profissional. Muito Obrigado!

Ao José Eduardo Gonçalves e a Regina Correia Gonçalves pelo apoio, amizade e ensinamentos durante todos esses anos de convivência, desde a época de graduação. O que contribuiu tanto para a minha vida profissional como pessoal.

A Professora Tânia e suas alunas, Karine e Patrícia, pelo auxílio e colaboração nos experimentos na área de antivirais.

À banca dessa dissertação.

Aos professores do programa que contribuíram pelo conhecimento proporcionado, principalmente aos que eu tive mais contato, João Carlos, Celso, Ciomar, Graciette.

Aos colegas de laboratório Gisely, Marco, Gislaine, Eliana, Helena, Andrea, Milene, Elizandra, Adriana, Raissa, Rodrigo, Admir, Fábio, Andressa, Marcelo, Márcia, Patrícia, Renata, Traudi pelos conhecimentos trocados e momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório de química farmacêutica, pelo apoio, amizade, conversas e auxílio em alguns experimentos.

Aos meus amigos Alexandra, Hugo, Rauffer, Gleice, Carlos, Murilo, Juliana, Marcos, Cristiane, Livia, Fagner, Fabrício, Letycia e Diego por me ajudarem e apoiarem em todos os momentos, compartilhando muitas risadas e algumas tristezas. Pessoas especiais que sempre serão lembradas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Principalmente a Helena, que sempre me ajudou.

Em especial ao meu pai Aloísio, a minha mãe Clara e ao meu irmão Lucas pela amizade, carinho, companheirismo, paciência nos momentos mais críticos de minha vida como e, por terem me ensinado a nunca desistir de lutar, sempre perseverar em busca dos meus objetivos.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA COMPARATIVA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DAS PARTES AÉREAS E DE CULTURA DE CALOS DE *Cereus peruvianus* Mill. (CACTACEAE)

O cacto conhecido como "Mandacaru", *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae), possui muitas aplicações com fins econômicos. Além da planta, a cultura de calos pode também ser uma fonte alternativa de polissacarídeos. Contudo, existe uma carência de informações quanto à caracterização química e aplicação biológica de polissacarídeos de *C. peruvianus*. Após obtenção dos polissacarídeos com água destilada seguido da precipitação com etanol, obteve-se o polissacarídeo bruto da planta (PP) e o polissacarídeo bruto do calos (PC). Em seguida, os polissacarídeos foram submetidos ao processo de purificação e caracterização parcial, obtendo o polissacarídeo purificado da planta (PP2) e o polissacarídeo purificado do calos (PC2). O teor de carboidratos totais no PP2 e no PC2 foi determinado como sendo de 24,97% e 30,41%, respectivamente, e o teor de proteínas no PP2 foi de 0,10% e no PC2 de 0,12%. O polissacarídeo das partes aéreas é composto por arabinose, galactose, rhamnose e ácido urônico na proporção de 66:15:6:13 e o do calo por arabinose, galactose e ramnose na proporção de 95:3:2. Alguns testes de atividade biológica foram realizados entre elas a atividade antiinflamatória, antiúlcera e antiviral. A análise antiviral contra HSV-1 pelo método colorimétrico da sulforrodamida B mostrou que ambos os polissacarídeos apresentaram baixa citotoxicidade (CC_{50} acima de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para as amostras PP e PC; de $440.00 \pm 59.22 \mu\text{g}/\text{ml}$ para PC2 e $483.33 \pm 56.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ para PP2) e apresentou atividade antiviral EC_{50} próximo de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para ambas as amostras (PP e PC). Contudo essa atividade não foi encontrada nas amostras purificadas (PP2 e PC2). No ensaio de atividade antiinflamatória, realizado pelo método de inibição de edema de orelha induzido por TPA, houve uma redução do edema de $29 \pm 5,0\%$ para o PP (100 mg/ Kg) e de $51 \pm 8,0\%$ para o PC (100 mg/ Kg). Já no ensaio de edema de pata induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) apenas o polissacarídeo obtido dos calos apresentou capacidade de inibir o edema ($37 \pm 9\%$). No teste da atividade antiúlcera apenas o polissacarídeo obtido das partes aéreas (PP) foi testado e apresentou uma atividade significativa com um ED_{50} de 49.0 mg.kg⁻¹. Observou-se que os polissacarídeos obtidos da plantas e da cultura de calos apresentam variações em suas estruturas relacionadas ao teor e composição dos açúcares monoméricos o que explica as diferenças em suas características químicas, físicas e farmacológicas. A inibição das lesões gástricas e a atividade antiinflamatória do PP permitem sugerir o uso deste polissacarídeo purificado ou do extrato bruto hidro-alcoólica das hastes de *C. peruvianus* na forma de um aditivo alimentar.

ABSTRACT

COMPARATIVE CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF POLYSACCHARIDES OBTAINED FROM AERIALS PARTS OF *Cereus peruvianus* Mill. (CACTACEAE)

The cactus known as "Mandacaru", *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae), has many applications for economic purposes. Besides the plant, callus culture may also be an alternative source of polysaccharides. However, there is a lack of information regarding the chemical and biological application of polysaccharides from *C. peruvianus*. After obtaining the polysaccharides with distilled water followed by precipitation with ethanol, we obtained the raw plant polysaccharide (PP) and the polysaccharide gross callus (PC). Then the polysaccharides were subjected to the purification and partial characterization, obtaining the polysaccharide purified plant (PP2) and the polysaccharide purified from callus (PC2). The total carbohydrate in PP2 and PC2 was determined as being 24.97% and 30.41%, respectively, and the protein content of PP2 was 0.10% and 0.12% in PC2. The polysaccharide from aerial parts is composed of arabinose, galactose, rhamnose and uronic acid in the proportion of the callus and 66:15:6:13 by arabinose, galactose and rhamnose at a ratio of 95:3:2. Some biological activity tests were carried out between them anti-inflammatory, antiulcer and antiviral. Analysis antiviral against HSV-1 by sulphorodamine B colorimetric method showed that both polysaccharides showed low cytotoxicity (CC50 above 500 mg / ml for samples PP and PC; of 440.00 ± 59.22 mg / ml for PC2 and 483.33 ± 56.25 g / ml for PP2) and exhibited antiviral activity EC 50 around 16 g / ml for both samples (PP and PC). However this activity was not found in purified samples (PP2 and PC2). In the trial of anti-inflammatory activity, performed by the method of inhibition of ear edema induced by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), a reduction in the edema of $29 \pm 5.0\%$ for PP (100 mg / kg) and $51 \pm 8.0\%$ for PC (100 mg / kg). In the test of paw edema induced by TPA only the polysaccharide obtained from the callus showed ability to inhibit the edema ($37 \pm 9\%$). In the activity test antiulcer only the polysaccharide obtained from aerial parts (PP) was tested and showed significant activity with an ED50 of 49.0 mg.kg⁻¹. It was observed that the polysaccharides obtained from plants and callus culture vary in their structures related to the content and composition of monomer sugars which explains the differences in their chemical, physical and pharmacological. Inhibition of gastric lesions and anti-inflammatory activity of PP may suggest the use of this polysaccharide purified or crude hydro-alcoholic extract of the stems of *C. peruvianus* in the form of a food additive.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
RMN ¹³ C	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
AVC	Aciclovir
ASB	Albumina de soro bovino
CC ₅₀	Concentração do composto que é tóxica para 50% das células
CMV	Citomegalovírus
CuSO ₄	Sulfato de cobre
D ₂ O	Água deuterada
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EC ₅₀	Dose efetiva para proteger 50% da monocamada de células Vero
ED ₅₀	Dose efetiva 50%
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho incorporando transformador Fourier
HSV-1	Vírus herpes simples tipo 1
IS	Índice de seletividade
kDa	Kilodaltons
MHz	Mega-hertz
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaBH ₄	Boroidreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Polissacarídeos obtidos da cultura de calos
PC2	Polissacarídeos obtidos da cultura de calos purificados

PP	Polissacarídeos obtidos das partes aéreas da planta
PP2	Polissacarídeos obtidos das partes aéreas da planta purificados
RMN	Ressonância magnética nuclear
SBF	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome da imune deficiência adquirida
TCA	Ácido tricloroacético
TCID 80	Tissue Culture Infectious Dose - título viral capaz de destruir 80% da monocamada
TFA	Ácido trifluoracético
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
Via I.P.	Via intraperitoneal

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Utilização de alguns polissacarídeos produzidos industrialmente.....	27
TABELA 2.	Quantificação de açúcares totais e proteínas totais das amostras.....	47
TABELA 3.	Avaliação da citotoxicidade dos polissacarídeos extraídas da cultura de calos (PC) e do cacto (PP).....	55
TABELA 4.	Avaliação da atividade antiviral das amostras PP e PC.....	55
TABELA 5.	Avaliação da atividade antiviral das amostras PP2 e PC2.....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	<i>C. peruvianus</i> cultivado no horto da UEM.....	17
FIGURA 2.	Haste do <i>C. peruvianus</i> cortada	31
FIGURA 3.	Haste do <i>C. peruvianus</i> cortada sem espinhos e o miolo	32
FIGURA 4.	Precipitação dos polissacarídeos do <i>C. peruvianus</i>	32
FIGURA 5.	Cultura de calos de <i>C. peruvianus</i>	33
FIGURA 6.	Estrutura das hastes de <i>C. peruvianus</i>	44
FIGURA 7.	Fluxograma do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos das partes aéreas e da cultura de calos de <i>C. peruvianus</i>	46
FIGURA 8.	Eletoferogramas dos padrões frutose (A), galactose (B), glicose (C) e da mistura (D).....	49
FIGURA 9.	(A) Espectro de RMN ¹³ C (100,61 MHz, D ₂ O) dos polissacarídeos obtidos das partes aéreas da planta. (B) Espectro de RMN ¹³ C (100,61 MHz, D ₂ O) dos polissacarídeos obtidos da cultura de calos.....	51
FIGURA 10.	(A) Espectro de RMN ¹ H (400,13 MHz, D ₂ O) de PP. (B) Espectro de RMN ¹ H (400,13 MHz, D ₂ O) de PC.....	52
FIGURA 11.	Efeito protetivo do PC2 testado com doses de 10, 30, e 100 mg/kg, v.o., contra lesões gástricas induzidas por etanol.....	54
FIGURA 12.	Efeito dos polissacarídeos e da dexametasona aplicados por via intraperitoneal no edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA	57
FIGURA 13.	Efeito dos polissacarídeos e da dexametasona aplicados por via intraperitoneal no edema de pata induzido pela aplicação subplantar de TPA.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Cereus peruvianus	16
2.2 Cultura de tecidos vegetais	20
2.3 Calogênese	21
2.4 Polissacarídeos de vegetais.....	23
2.5 Aplicações dos polissacarídeos	25
2.6 Atividades biológicas dos polissacarídeos	28
2.7 Atividade antiúlcera dos polissacarídeos.....	28
2.8 Atividade antiinflamatória dos polissacarídeos.....	29
2.9 Atividade antiviral dos polissacarídeos.....	29
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Extração e purificação dos polissacarídeos	31
4.2 Caracterização química dos polissacarídeos	35
4.2.1 Composição monossacarídica	35
4.3 Métodos cromatográficos	35
4.3.1 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	35
4.3.2 Eletroforese capilar.....	36
4.4 Análise espectroscópica.....	36
4.4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	36
4.5 Análise espectrofotométrica	37
4.5.1 Dosagem de açúcar total	37
4.5.2 Dosagem de proteínas totais	38
4.5.2.2 Preparo do reagente de biureto	38
4.6 Avaliação das atividades biológicas	39
4.6.1 Atividade antiúlcera.....	39
4.6.2 Atividade antiviral	39

4.6.3 Atividade antiinflamatória	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Extração e purificação	44
5.2 Caracterização estrutural	48
5.3 Atividade antiúlcera	53
5.4 Atividade antiviral	54
5.5 Atividade antiinflamatória	57
6 CONCLUSÃO.....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

No Brasil o uso de plantas medicinais é muito difundido entre a população. O conhecimento popular em relação às propriedades medicinais de muitas ervas e plantas somada à enorme biodiversidade existente poderia induzir ao desenvolvimento de novos medicamentos. No entanto, pouco desta biodiversidade foi totalmente estudada, visto que existem inúmeras espécies vegetais, animais e microrganismos que requerem investigação (DAVET, 2005; GUERRA e NODARI, 2001; NIERO, *et al.*, 2003).

As plantas constituem a mais rica fonte natural de biomoléculas utilizadas pelo homem. Elas tem hoje, um papel muito importante nas áreas de fitoquímica e farmacognosia, não apenas pela utilização direta de seus constituintes como agentes terapêuticos, mas como precursores na síntese de novas drogas e de compostos farmacologicamente ativos. Além disso, o desenvolvimento tecnológico possibilitou melhorar o isolamento e a caracterização dos componentes ativos e com isso aumentar a qualidade dos produtos de origem vegetal (BRISKIN, 2000; CECHINEL FILHO e YUNES, 2001; CUNHA, 2009; HALBERSTEIN, 2005).

Nas últimas décadas, a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos tem provocado o aumento do uso de produtos medicinais à base de plantas em muitos países. Com isso, diversas indústrias farmacêuticas têm investido na área de produtos naturais, pois podem encontrar na natureza uma fonte inesgotável de novas estruturas químicas a serem descobertas, visando desenvolver novos medicamentos que serão possíveis alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que ainda não apresentam cura ou tratamento adequado (GUERRA e NODARI, 2001; CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).

Uma das alternativas ao extrativismo utilizado para se obter produtos naturais de plantas é o cultivo de tecidos (calos). Em geral, os calos organogênicos, com tecidos mais diferenciados, produzem uma maior quantidade de metabólitos secundários devido à maior diferenciação dos tecidos de interesse (OKSMAN-CALDENTEY e INZÉ, 2004; RAO e RAVISHANKAR, 2002).

Esta cultura é realizada por meio da retirada de um pedaço estéril de tecido de uma planta, cultivando-a *in vitro*, em um meio de cultura adequado, contendo fitoreguladores de crescimento. Estas condições podem estimular as células a se dividirem por mitoses sucessivas formando uma massa de células não diferenciadas, conhecida como calo. Além da formação de calos, as condições de cultura podem estimular o desenvolvimento de órgãos particulares e até de uma planta completa. Com base nisso, muitas pesquisas com plantas medicinais têm como propósito comparar a produção de substâncias bioativas em cultivos apresentando diferentes níveis de diferenciação (FLORES, 2006; FLORIANO, 2004; RAO e RAVISHANKAR, 2002).

Além disso, usando-se essa estratégia biotecnológica pode-se estimular a biossíntese de compostos primários e secundários e que depende de diversos fatores, dentre os quais destacam-se o genótipo da planta, os explantes utilizados e as combinações dos fitoreguladores adicionados ao meio nutritivo (DINAN, 2001; TOMÁS, *et al.*, 1992).

Os polissacarídeos, uma classe primária de biomoléculas foram, inicialmente, considerados importantes para o homem somente do ponto de vista nutricional. No entanto, muito se tem investigado sobre as diferentes estruturas destas moléculas e suas potenciais aplicações biológicas (COS, *et al.*, 2006; PINTO, *et al.*, 2002).

Polissacarídeos de diferentes fontes naturais têm apresentado diversos efeitos biológicos, tais como: antiviral, leishmanicida, antitumoral, antioxidante, anticoagulante, antitussígeno, regulador intestinal e antitrombótico (CIPRIANI, *et al.*, 2006; CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009).

Uma ótima fonte de polissacarídeos são as cactáceas, as quais são compostas por cerca de 110 gêneros e de 1.306 espécies, dividida em três subfamílias: *Opuntioideae*, *Pereskioideae* e *Cactoideae*. Elas ocupam regiões áridas e apresentam profundas modificações anatômicas, associadas com a adaptação ao meio seco, podendo ocupar também zonas subtropicais e tropicais úmidas onde vivem como epífitas. Suas adaptações facilitam o acúmulo de água e, com o que

armazenam, sobrevivem aos períodos secos (BARTHLOTT e HUNT, 1993; NYFFELER, 2002; ROCHA e AGRA, 2002; SAYED, ABOU-DAHAB e YOUSSEF, 2005).

O cacto *Cereus peruvianus* Mill., Cactaceae, possui muitas aplicações com fins econômicos (ALVAREZ *et al.*, 1992, 1995; NOZAKI, MESSERSCHMIDT e RODRIGUES, 1993; OLIVEIRA e MACHADO, 2003), e recentemente vem sendo domesticada e cultivada na região de Israel (MIZRAHI e NERD, 1999).

Como visto, os polissacarídeos são importantes biopolímeros podendo ter diferentes aplicações. Informações sobre isolamento, estrutura química, propriedades físico-químicas e atividades biológicas são essenciais para futuras aplicações dessas macromoléculas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Cereus peruvianus*

O gênero *Cereus* é um dos mais antigos entre os cactos, sendo descrito por Philip Miller em 1754. Aparentemente, o nome tem sua origem em relatos de um livro publicado em 1625. O nome *Cereus* tem origem grega, e significa “tocha” e refere-se a forma de candelabro dos seus ramos, conforme observado pelos primeiros exploradores do continente americano. *Cereus* também refere-se a “cera” no latim, podendo estar relacionado com o tipo de cutícula que recobre os ramos deste cacto (ANDERSON, 2000; BRITTON e ROSE, 1919; CHIDAMIAN, 1984; HUGHES, RAMOS e MOYNA, 1980; SILVA, 1983).

A morfologia dos caules nas cactáceas pode ser considerada uma característica marcante, sendo usada há mais de 4 décadas para discriminar gêneros e espécies de cactos (ALTESOR e EZCURRA, 2003). No gênero *Cereus*, por exemplo, podem ser encontradas 34 espécies diferentes são descritas como constituídas por caule do tipo colunar com número e disposição de costelas longitudinais variáveis, onde estão inseridos os botões axilares contendo espinhos (folhas modificadas) conhecidos como aréolas. A presença de aréolas é uma característica da família Cactaceae e a organização destas estruturas nos caules parece estar fortemente ligada à distribuição dos feixes vasculares (ANDERSON, 2000; BRITTON e ROSE, 1919; CHIDAMIAN, 1984; GLIMN-LACY e KAUFMAN, 2006; INGROUILLE e EDDIE, 2006; ROCHFORD, 1976).

As espécies mais conhecidas são *Cereus peruvianus* (Figura 1) e *Cereus jamacaru*, ambos cultivados no nordeste brasileiro. Eles são cactos popularmente conhecidos como “mandacarus”, nome tupi que significa “feixe ou molho pungente, cheio de espinhos” (GLIMN-LACY e KAUFMAN, 2006; NERD, TEL-ZUR e MIZRAHI, 2002; RESENDE, 2006; SILVA, 1983, OLIVEIRA, *et al.*, 1995). Segundo Oliveira, e colaboradores (1995), *C. peruvianus* distribui-se no Nordeste do Brasil, geralmente nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Apesar de sua origem não ser bem esclarecida, o *C. peruvianus* é uma espécie natural da América Central e do Sul, sendo denominada

em muitos lugares como tocha peruana, possuindo flores, frutos e caule comestíveis. É um cacto ornamental, que pode ser encontrado em jardins de países tropicais e subtropicais (OLIVEIRA *et al.*, 2001; SAYED, ABOU-DAHAB e YOUSSEF, 2005; MACHADO, COLLET e MANGOLIN, 1999; MIZRAHI e NERD, 1999).

O *C. peruvianus* Miller é espécie de porte arbóreo, atingindo, em média, 4 a 5 m de altura, embora plantas com até 7 m possam ser encontradas. O Caule é colunar, com ramificações candelabriformes. Ao longo do seu comprimento, os ramos são divididos por constrictões, que formam segmentos distintos chamados artículos, cujos comprimentos variam de 50 a 60 cm. Em *C. peruvianus*, espinhos e flores originam-se da mesma aréola. Nos ramos das plantas jovens (indivíduos com até 2 m de altura), a maioria das aréolas contém espinhos, geralmente em número de seis, medindo de 1 a 3 cm de comprimento, de cor amarelada e relativamente flexíveis. Nas plantas adultas, os ramos mais próximos do solo possuem aréolas com espinhos escuros e rígidos; nos ramos apicais há normalmente uma redução no número e comprimento dos espinhos nas aréolas. A coloração geral da planta é glauca (verde-azulado-acinzentado), devido a presença de cera na cutícula (SILVA, 1983).



Figura 1. *C. peruvianus* cultivado no horto da UEM.

FONTE: Tanaka, 2008

Mizrahi e Nerd (1999) mostram ainda que *C. peruvianus* possui uma produção das hastes precoce de 3-5 anos através das sementes e de 2-3 anos através de cortes. As flores são noturnas,

solitárias, sésseis, actinomorfas e hemafroditas. A polinização é feita por abelhas. Baixas temperaturas resultam um grande prejuízo para a planta, e não foi encontrado prejuízos em temperaturas acima de 45 °C.

Os frutos são bagas carnosas, oblongas, glabras, indeiscentes, medindo cerca de 90 mm de comprimento e 60 mm de diâmetro. A parede do fruto possui, aproximadamente, 6 mm de espessura. As cores dos frutos são variadas, podendo encontrar-se desde frutos com coloração homogênea (amarelo ou laranja), até os que possuem uma combinação de duas ou três cores (verde e amarelo; verde e laranja; verde, amarelo e laranja; verde, laranja e vermelho-coral). A polpa que origina-se do desenvolvimento da placenta, é consistente, branca, adocicada e contém numerosas sementes pretas (cerca de 2000), reniformes, medindo 3 mm de comprimento e 2 mm de largura. Esse fruto foi vendido pela primeira vez na Europa em 1997 com o nome de Koubo (NINIO *et al.*, 2003; SILVA, 1983).

No Brasil, *C. peruvianus*, apesar de seu baixo teor de proteína e vitaminas, é utilizado como alimento humano e para o gado (bovino, caprino e ovino) em períodos de seca. Isto graças a mecanismos que favorecem a absorção e a retenção de água. O desenvolvimento dessas estruturas especializadas, tornam as cactáceas fontes produtoras de ceras utilizadas como impermeabilizantes de tintas e de vernizes (OLIVEIRA *et al.*, 2001; SAYED, ABOU-DAHAB e YOUSSEF, 2005; MACHADO, COLLET e MANGOLIN, 1999; MIZRAHI e NERD, 1999).

No trabalho realizado por Mizrahi e Nerd (1999), o *C. peruvianus* foi domesticado na região de Israel e se mostrou uma promissora espécie produtora de frutos comercializáveis para a Europa, melhorando assim, o mercado exportador de Israel. Os trabalhos de Ninio e colaboradores (2003) e Oliveira e colaboradores (1992) verificam a qualidade de estocagem e as propriedades físicas e físico-químicas desses frutos.

Os estudos mais aprofundados sobre o comportamento de *C. peruvianus* e de suas propriedades (ALVAREZ *et al.*, 1992), verificaram que as plantas desta espécie produzem alcalóides (OLIVEIRA e MACHADO, 2003), ésteres de cera com potencial de aplicação como barreira

impermeável (DEMBITSKY e REZENKA, 1996; REZENKA e DEMBITSKY, 1998), e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais como: floculação de impurezas (NOZAKI, MESSERSCHMIDT e RODRIGUES, 1993), tratamento de efluentes (BARROS e NOZAKI, 2002) e produção de polieletrólitos (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos de análise bioquímica demonstraram a presença de determinadas enzimas (álcool desidrogenases, malato desidrogenases, esterases, isoperoxidase, isocitrato desidrogenase e fosfatase ácida (OLIVEIRA *et al.*, 1995; MANGOLIN e MACHADO, 1997; MANGOLIN, PRIOLI e MACHADO, 1994a, b) em cultura de tecidos de *C. peruvianus*, abrindo a possibilidade da utilização dessas culturas como um catalisador biológico.

Lima e colaboradores (2006) e Andrade, Marques e Zappi (2006) descreveram o uso de extratos de *C. peruvianus*, juntamente com outras plantas, como um fitoterápico com uma significativa ação cicatrizante. Para o *C. peruvianus* é atribuído a assepsia das regiões lesionadas, devido às ações deterativas que a planta possui.

Em função do interesse em usar esta planta como fonte de produtos de interesse industrial e econômico, também foi desenvolvido um trabalho com técnicas de cultura de tecidos para a produção de plantas desta espécie. Dentre as várias técnicas de cultura *in vitro*, a cultura de tecidos de calos foi considerada como ideal, pois de um pequeno pedaço de tecido de calo pode ser multiplicada e produzido uma grande quantidade de células, que podem ser induzidas a regenerar um número também desejável de plantas (OLIVEIRA *et al.*, 1995; SAYED, ABOU-DAHAB e YOUSSEF, 2005).

Como se pode notar, *C. peruvianus* possui produtos de interesse industrial e econômico. Contudo, são necessários estudos a respeito de suas outras possíveis aplicações, como atividade biológica e, também, estudos sobre outros de seus componentes, como os polissacarídeos.

2.2 Cultura de tecidos vegetais

Esta técnica de cultura consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas adequadas, sendo uma das áreas de maior êxito da biotecnologia. A regeneração de plantas através da cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que em 1902 enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira. Além disso, os vegetais são capazes de produzir um grande número de metabólitos *in vitro* (FLORES, 2006; MACHADO *et al.*, 2004; MARTINS e NICOLOSO, 2004; OLIVEIRA e MACHADO, 2003; RAO e RAVISHANKAR, 2002).

A seleção e o desenvolvimento de um meio de cultura são essenciais para qualquer trabalho em cultura de tecidos de plantas. Dentre os componentes essenciais de meio de cultivo estão a água, sais inorgânicos, vitaminas, fonte de carbono e os fitoreguladores. Existem diversos meios de cultura citados na literatura para a indução de calogênese e morfogênese, porém o meio de Murashige & Skoog (MS) (1962) é o mais utilizado (FLORES, MALDANER e NICOLOSO, 2006; MARTINS e NICOLOSO, 2004; NICOLOSO *et al.*, 2001).

O cultivo *in vitro* de plantas é influenciado pelo meio nutritivo, tipos e condições fisiológicas dos explantes, genótipos, condições de cultivo e pelos fitoreguladores. A escolha do explante é de fundamental importância devido às diferentes respostas dos tecidos frente às combinações hormonais e condições de cultivo *in vitro*. Em geral, durante o desenvolvimento de protocolos de regeneração e/ou estabelecimento de calos, vários ensaios são conduzidos inicialmente no sentido de determinar a melhor fonte de explante e combinações hormonais (KHAWAR *et al.*, 2004; TIWARI, TIWARI e SINGH, 2001; VENKATAIAH, CHRISTOPHER e SUBHASH, 2003).

Em alguns casos, é possível obter respostas *in vitro* sem o uso de fitoreguladores. No entanto, na maioria das vezes, quando se utiliza explantes formados por tecidos diferenciados, como segmentos de folhas, raízes e entrenós, é necessário adicionar fitoreguladores no meio de cultura para que a

morfogênese e/ou calogênese seja induzida. A concentração ideal dos fitoreguladores depende dos padrões de absorção, translocação e metabolismo na planta. Devido a isto, as concentrações efetivas de cada fitoregulador podem variar e necessitam ser ajustadas de acordo com o tipo de tecido ou órgão, do método de cultivo e do estágio da cultura (FLORES, 2006).

O desenvolvimento vegetal é regulado por vários tipos de hormônios vegetais: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas e brassinoesteróides. Entretanto, várias outras moléculas sinalizadoras também têm sido identificadas em plantas, como ácido jasmônico, o ácido salicílico e a sistemina, as quais participam dos processos de resistência à patógenos e de defesa contra herbívoros (DAVIES, 1990; KENDE e ZEEVAART, 1997).

Para o cultivo *in vitro*, os hormônios vegetais mais importantes são as auxinas e citocininas, seguido pelo ácido giberélico e ácido abscísico. As auxinas juntamente com as citocininas regulam o crescimento e a morfogênese (DAVIES, 1990; FLORES, 2006; GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

O uso de cultura de tecido e células de *C. peruvianus* para a biosíntese de produtos naturais em escala industrial, vem sendo descrito e têm sido proposto para se obter plantas cujas substâncias apresentam características comercializáveis (MACHADO *et al.*, 2004; OLIVEIRA e MACHADO, 2003).

2.3 Calogênese

A organogênese refere-se à formação de estruturas monopolares como raízes, brotos e flores a partir de explantes ou de calos cultivados *in vitro*. Em geral, explantes cultivados em meio contendo uma alta relação auxina/citocinina são induzidos a formar calos. O meio de cultura utilizado para a indução de calos pode, ao mesmo tempo, induzir a regeneração de brotações e/ou raízes. Porém, em muitos casos, os calos precisam ser transferidos para outro meio com diferentes combinações e/ou concentrações de fitoreguladores para que ocorra a regeneração (FLORES, 2006).

O calo é um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante. Os calos podem ser diferentes em textura (lisa, irregular, nodular ou farinácea), consistência (compacto, friável, esponjoso e pulverulento) e coloração. Entre os fatores que interferem na consistência dos calos, destacam-se o meio de cultivo, subcultivos e fitoreguladores (FLORES, 2006).

Recentemente, o cultivo de calos tem sido uma alternativa viável para o estudo e a produção de metabólitos primários e secundários. Calos com diferentes taxas de crescimento e níveis de diferenciação podem diferir na capacidade de sintetizar compostos bioativos (ARIKAT *et al.*, 2004; KRISHNAVENI e RAO, 2000; MACHADO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2002; TOKER *et al.*, 2003).

Segundo diversos autores (FLORES, 2006; OKSMAN-CALDENTEY e INZÉ, 2004; RAO e RAVISHANKAR, 2002), a produção de metabólitos por plantas cultivadas *in vitro* apresenta inúmeras vantagens como:

- a) a independência de fatores ambientais como clima, temperatura, luminosidade, solo, espaço, etc.;
- b) o controle e a otimização das condições de crescimento *in vitro*;
- c) a seleção e a produção de genótipos homogêneos em larga escala;
- d) a possibilidade de produzir compostos normalmente não encontrados na planta mãe;
- e) a maior facilidade para o estudo sobre o metabolismo dos compostos;
- f) um maior controle na produção, na estabilidade e qualidade dos produtos, sendo os fatores tempo, custos e preços bem mais previsíveis quando comparado com os métodos tradicionais.

Com isso, várias estratégias vêm sendo empregadas com o intuito de maximizar os valores de produtividade de compostos primários e secundários em cultura de tecidos vegetais. Estes fatores são conhecidos como manipulação epigenética (VERPOORTE e MARASCHIN, 2001).

2.4 Polissacarídeos de vegetais

Diversos produtos como medicamentos, alimentos, óleos, cosméticos, têm como fonte a biodiversidade brasileira. A partir desta biodiversidade podem ser obtidas inúmeras classes de compostos, como os polissacarídeos, os quais são polímeros naturais que compreendem umas das mais amplas classes de moléculas orgânicas e que desempenham um papel fundamental em uma variedade de funções biológicas (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009; REID, 1997).

Os polissacarídeos são formados pela condensação entre o grupo hemiacetal de um monômero contendo um grupo álcool e outro, com a conseguinte perda de água, dando origem a uma ligação glicosídica. Geralmente contém centenas de unidades monoméricas interligadas, as quais são freqüentemente chamadas de açúcares ou carboidratos devido a sua fórmula molecular $C_x(H_2O)_y$, que representa um hidrato de carbono (VIANA FILHO, 2009).

As características estruturais, que determinam suas propriedades funcionais, são os monômeros (constituintes e tipo de ligação glicosídica entre eles). Sendo classificados como homopolissacarídeos quando todos os monômeros são idênticos, e como heteropolissacarídeos quando existem dois ou mais monômeros diferentes (VIANA FILHO, 2009).

Os polissacarídeos ao contrário dos polímeros sintéticos são abundantes e obtidos a partir de fontes renováveis como algas, plantas e microrganismos. Apresentam uma grande variedade de composições e propriedades que dificilmente podem ser mimetizadas em laboratórios químicos. Além disso, devido a sua fácil obtenção possuem menor custo e ainda são biodegradáveis (COVIELLO, *et al.*, 2007; NISHINARI e TAKAHASHI, 2003; RENAUD, BELGACEM e RINAUDO, 2000).

Nas plantas é possível encontrar os polissacarídeos sob diferentes formas, sendo a parede celular a principal. Os carboidratos existem como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, tais como: glicosídeos cianogênicos e fenólicos, flavonóides glicosilados e glicoproteínas. Por estarem presentes na maioria dos tecidos e células de plantas, como consequência os carboidratos estruturais das plantas formam a mais abundante reserva de compostos naturais disponível na Terra (AVIGAD e DEY, 1997; BUCKERIDGE, SANTOS e TINÉ, 2000; REID, 1997).

Segundo DEY e colaboradores (1997) a parede celular primária das dicotiledôneas é composta por 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% material péctico e 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos, enquanto a parede celular secundária tipicamente é composta por 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e quantidade negligenciável de pectina.

O polissacarídeo rico em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose é conhecido com pectina. Sendo seus constituintes fundamentais o ácido poligalacturônico e as ramnogalacturonanas I. As arabinanas, galactanas e arabinogalactanas são freqüentemente encontradas em cadeias laterais das ramnogalacturonanas I (O'NEILL *et al.*, 1990; BRETT e WALDRON, 1990; CARPITA e GIBEAUT, 1993). Já a hemicelulose refere-se aos polissacarídeos presentes em tecidos vegetais que ocorrem juntamente com a celulose e que podem ser isolados através de extrações aquosas ou alcalinas. Estes monossacarídeos encontram-se glicosidicamente ligados, constituindo diferentes polissacarídeos, sendo os principais incluídos nas classes denominadas arabinogalactanas, arabinoxilanas, xilanas, galactoglucomananas, glucuronoxilanas, glucomananas, mananas e xiloglucanas (GRABRIELLI *et al.*, 2000; KACURÁKOVÁ *et al.*, 2000; PULS e SCHUSEIL, 1993).

As arabinogalactanas são polissacarídeos estruturais, presentes em todos os vegetais superiores, possuindo uma estrutura molecular complexa e de difícil caracterização. Porém existem diversos trabalhos envolvendo a elucidação estrutural destes polímeros, encontrados nas folhas, nos

caules, nas raízes, nas flores, nas sementes e, em grande quantidade, em gomas e exsudatos de vegetais (FINCHER, STONE e CLARK 1983; DELGOBO *et al.*, 1999; MENESTRINA *et al.*, 1998; WHISTLER, 1970).

A elucidação estrutural das arabinogalactanas é também importante para uma maior compreensão da real estrutura da parede celular primária de vegetais superiores. Diversos trabalhos científicos têm demonstrado uma maior diversidade estrutural de moléculas como as arabinogalactanas, demonstraram estruturas químicas com alto grau de complexidade, contendo arabinose, galactose, ramnose, xilose, manose e glucose. A diversidade também é evidenciada na massa molar e nas ligações glicosídicas entre as unidades que compõem as cadeias laterais destas moléculas, o que gera um aumento em relação a descrição de propriedades biológicas para estes polissacarídeos (CAPEK *et al.*, 2003; CIPRIANI *et al.*, 2004; DIALLO *et al.*, 2003; KARDOSOVÁ *et al.*, 2004).

2.5 Aplicações dos polissacarídeos

Polissacarídeos naturais têm sido amplamente investigados nos últimos anos em relação às suas características e aplicações. Algumas de suas propriedades são a sua grande disponibilidade na natureza, ampla variedade de estruturas, baixo custo de aquisição, boa estabilidade, boa propriedade geleificante, biocompatibilidade, atoxicidade e de fácil modificação química e bioquímica (EIRAS *et al.*, 2007; SOUTO-MAIOR *et al.*, 2008).

Diversos polissacarídeos das mais diversas origens como dextrana e goma xantana (microrganismos), pectina e amilose (vegetais), alginato (alga), sulfato de condroitina e quitosana (animais), têm sido sugeridos como excelentes para aplicação no desenvolvimento de novos materiais (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009; SOUTO-MAIOR *et al.*, 2008)

A sua ampla variedade de estruturas gera uma vasta faixa de aplicações como: modificadores de textura, espessantes, agentes geleificantes, estabilizantes, retentor de umidade, dentre outros. Na

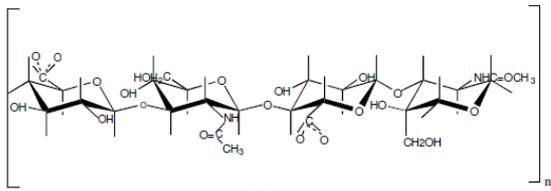
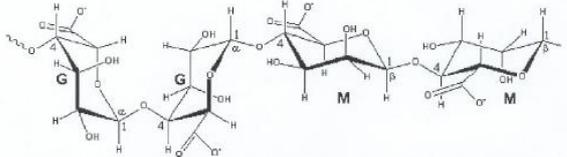
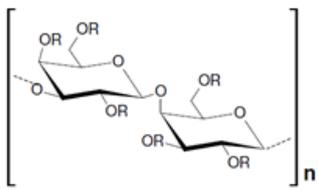
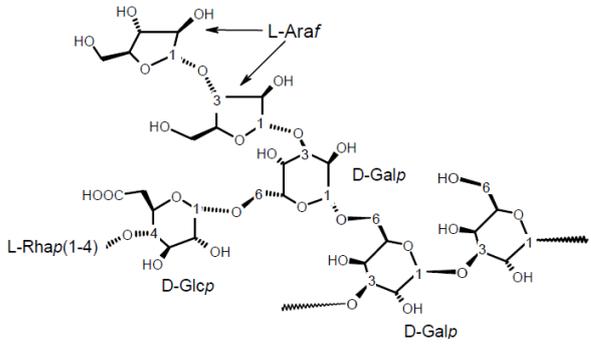
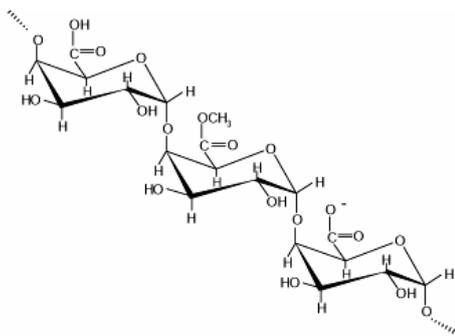
área biológica possuem diversas aplicações como em engenharia de tecidos, imobilização de enzimas, biossensores, como veículo de liberação de fármaco e alguns ainda são utilizados para remoção de metais pesados e como aditivo de concreto (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009; CUNHA *et al.*, 2004; LEE e PARK, 2001; MOON e LEE, 2004; NISHINARI, ZHANG e IKEDA, 2000; RINAUDO, 2001).

Um tipo de polissacarídeo que vem sendo estudada são as arabinogalactanas que são polissacarídeos estruturais, presentes em todos os vegetais superiores, tendo uma estrutura molecular complexa e de difícil caracterização (BRECKER *et al.*, 2005; FINCHER, STONE e CLARKE, 1983). Diversos trabalhos foram realizados envolvendo a elucidação estrutural deste polímero, encontrado em folhas, caules, raízes, flores, sementes, gomas e exudatos de vegetais (CIPRIANI *et al.*, 2004; DELGOBO *et al.*, 1998; MELLINGER *et al.*, 2008; MENESTRINA *et al.*, 1998).

No âmbito industrial, pode-se citar o intenso uso de arabinogalactanas da tão conhecida goma arábica, proveniente de árvores de diferentes espécies de *Acácia* (MELLINGER, 2006). Além disso devido a sua baixa viscosidade e boa emulsificação as arabinogalactanas podem ser aplicadas em bebidas refrigeradas e não refrigeradas como também em barras nutritivas (REDGWELL *et al.*, 2005).

Além dessas utilizações, podem-se destacar outros usos importantes de alguns polissacarídeos, como mostra a tabela 1:

Tabela 1. Utilização de alguns polissacarídeos produzidos industrialmente.

Polissacarídeo	Estrutura Básica	Utilização	Referência
Ácido Hialurônico	 <p>Fonte: Romanholi, 2005</p>	Engenharia de Tecidos Liberção de Fármacos	Cunha, Paula e Feitosa, 2009 Jain e Jain, 2008
Alginato	 <p>Fonte: Rezende <i>et al.</i>, 2010</p>	Imobilização de Células Engenharia de Tecidos	Murua <i>et al.</i> , 2008 Rezende <i>et al.</i> , 2010
Carragenana	 <p>R = H, SO₃ ou CH₃ Fonte: Faria-Tischer, 2006</p>	Agente Gelificante	Quemener <i>et al.</i> , 2010
Goma Arábica	 <p>Fonte: Fávoro <i>et al.</i>, 2006</p>	Imobilização de Células	Ramakrishnan <i>et al.</i> , 2007
Pectina	 <p>Fonte: Brandão e Andrade, 1999</p>	Engenharia de Tecidos	Cunha, Paula e Feitosa, 2009

Como mostra Cunha, Paula e Feitosa (2009), esta ampla gama de aplicações faz com que estes compostos contribuam para o mercado de importações e exportações mundial.

2.6 Atividades biológicas dos polissacarídeos

Os polissacarídeos apresentam uma grande diversidade de aplicações nas diversas áreas. Além disso, aumentou as investigações sobre as atividades biológicas que os polissacarídeos podem apresentar. Segundo Bohn e BeMiller (1995), as mais comuns são as atividades imunestimulante, antiviral, anticoagulante e antitumoral. Mas podem ser encontradas outras atividades como a antioxidante, antitrombótica, antiúlcera e antiinflamatória (CIPRIANI, 2007; CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009)

2.7 Atividade antiúlcera dos polissacarídeos

A úlcera gástrica decorre do desequilíbrio da integridade da mucosa gástrica. Grande parte da população é vítima dessa doença, sua etiologia ainda não está totalmente elucidada, mas geralmente está relacionada a fatores exógenos, como estresse, uso de antiinflamatórios não esteroidais, alcoolismo e infecção por *Helicobacter pylori* (DONATINI *et al.*, 2009).

De acordo com Arruda (2008) a atividade antiulcerogênica das substâncias pode ser determinada por vários modelos animais. Tais modelos utilizados representam os agentes etiológicos mais comuns envolvidos na úlcera gástrica humana, proporciona contar o número de úlceras e medir o tamanho de cada uma e verificar o índice de lesão, que reflete a gravidade da injúria.

Geralmente para verificar a atividade antiúlcera do composto obtido de plantas utiliza-se o método de indução de lesões gástricas por etanol, onde se avalia a proteção que o composto proporciona (CIPRIANI, 2007, DONATINI *et al.*, 2009).

Diversas plantas como *Maytenus ilicifolia* (CIPRIANI *et al.*, 2004); *Cochlospermum tinctorium* (NERGARD *et al.*, 2005); *Angelica sinensis* (YE *et al.*, 2003) e *Strychnos potatorum* (SANMUGAPRIYA e VENKATARAMAN, 2007), apresentaram uma atividade antiúlcera atribuída ao polissacarídeos presente. Sendo sugerido mecanismos para o efeito gastroprotetor dos polissacarídeos como: uma camada protetora pela habilidade destes polímeros de se ligar à superfície da mucosa gástrica; atividade anti-secretora de suco gástrico; proteção da mucosa pelo aumento da síntese de muco; e seqüestro de radicais livres.

2.8 Atividade antiinflamatória dos polissacarídeos

Diferentes abordagens terapêuticas são utilizadas com o objetivo de diminuir a dor, sendo a farmacoterapia a mais comum. Os fármacos antiinflamatórios estão entre os mais utilizados no mundo. Isso provavelmente se deve ao fato de terem sido uma das primeiras drogas a serem comercializadas e ao grande impacto produzido pela sua introdução como medicamento. Afinal, o alívio da dor, inflamação e febre com o uso de uma única droga é de enorme importância no tratamento de doenças, principalmente as doenças inflamatórias crônicas (FRANCISCHI *et al.*, 2005).

Os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) possuem uma atividade relacionada à inibição da síntese de importantes mediadores inflamatórios sendo utilizada para o alívio de edema, da dor e da febre nas desordens teciduais, em doenças alérgicas e nas doenças inflamatórias crônicas (BARNES, 1998; CELOTTI e LAUFER, 2001; TAYLOR e SHAW, 1993). As prostaglandinas são uns dos principais mediadores da inflamação, edema, dor e febre (VAINIO e MORGAN, 1997; VANE e BOTTING, 1990; VANE e BOTTING, 2003; YANG *et al.*, 1996) e são originadas pela oxidação do ácido araquidônico, pela ação das enzimas ciclooxigenases COX-1 (constitutiva) e/ou 2 (induzida) (ROWLEY *et al.*, 2005; VAN RYN e PAIRET, 1999; VANE e BOTTING, 2003;).

As plantas, seus produtos de extração e seus metabólitos secundários vêm sendo utilizados cada vez mais como remédio mesmo com o grande desenvolvimento de drogas obtidas por síntese orgânica. O uso popular de plantas na medicina tradicional é uma grande fonte de informação que auxiliam na descoberta de novos agentes terapêuticos (BOLDI, 2004; KOEHN, CARTER, 2005; MCCURDY; SCULLY, 2005). Assim compostos obtidos de vegetais, como os polissacarídeos, vêm sendo estudados visando sua utilização como um novo agente antiinflamatório (DA SILVA e PARENTE, 2001, 2010; BARRETO e PARENTE, 2005; GUZMÁN *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2000; POPOV *et al.*, 2005; SENDL *et al.*, 1993).

2.9 Atividade antiviral dos polissacarídeos

A família *Herpesviridae* possui diversos vírus patogênicos capazes de causar infecções em humanos. O vírus *Herpes simplex* tipo I (HSV-I) causa infecções localizadas, principalmente na região da boca. Após a infecção primária, o vírus se instala nos gânglios nervosos regionais, permanecendo latente, dormente, até ser reativado. O HSV-I é freqüentemente transmitido através do contato direto com lesões ou objetos contaminados. A disseminação assintomática dos vírus, através de fluídos orgânicos ou das lesões crostosas, constitui uma importante forma de transmissão (ZHU *et al.*, 2006; KANEKIYO *et al.*, 2007).

No começo da década de sessenta foi demonstrado que a heparina e outras substâncias polianiónicas agiam como inibidores do vírus da herpes. A maioria dos ensaios de atividade antiviral de polissacarídeos foram realizados com polímeros sulfatados, retirados de algas marinhas e cianobactérias (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009; GONZÁLEZ e CARRASCO, 1987). Estes estudos levaram à identificação de um grande número de polímeros de carboidratos com potentes efeitos inibitórios contra muitos vírus animais, incluindo importantes agentes patogênicos humanos, tais como: vírus da herpes (HSV), citomegalovírus (CMV) e vírus da SIDA (síndrome da imune deficiência adquirida) humana (SILVA, 2009; WITVROUW *et al.*, 1994). Contudo, falta na literatura científica informações sobre polissacarídeos não sulfatados com atividade antiviral.

3 OBJETIVOS

-Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos isolados, utilizando métodos físico-químicos de análise.

-Comparar a composição química dos polissacarídeos obtidos das partes aéreas e da cultura de calos.

-Avaliar as possíveis atividades biológicas destes polissacarídeos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extração e purificação dos polissacarídeos

Foram coletadas amostras de partes aéreas de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) do Horto de Plantas Medicinais Profa. Irenice Silva, localizado na Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os polissacarídeos foram obtidos conforme o procedimento descrito por Alvarez e colaboradores (1992). Foi coletada uma haste com aproximadamente 1,0 kg, lavou em água corrente. Os cladodos de *C. peruvianus* foram cortados em pedaços e os espinhos e a medula foram descartados (Figura 2 e 3).



Figura 2. Haste do *C. peruvianus* cortada

FONTE: Tanaka, 2008



Figura 3. Haste do *C. peruvianus* cortada sem espinhos e o miolo

FONTE: Tanaka, 2008

A esses pedaços foi adicionada água destilada e com o auxílio de um liquidificador, o material foi triturado. Três partes de etanol foram acrescentadas para que ocorresse a precipitação dos polissacarídeos (Figura 4). O material foi colocado na geladeira por 48 horas para facilitar a precipitação. Após esse período, o precipitado foi separado com uma peneira e foi lavado com etanol seguido de acetona. Após seco e liofilizado, o polissacarídeo bruto (PP) foi armazenado no freezer.



Figura 4. Precipitação dos polissacarídeos do *C. peruvianus*

FONTE: Tanaka, 2008

A cultura de calos (Figura 5) foi fornecida pelo laboratório da Profa. Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado, do Departamento de Biologia Celular e Genética. A cultura foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Oliveira e colaboradores (1995). O processo induz a proliferação celular a partir de fragmentos de hipocótilo em meio MS (MURASHIGE e SKOOG) suplementado com vitaminas do meio B5, de sacarose, de agar, além de água de coco e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e N6-furfuriladenina (cinetina). As placas de Petri contendo os explantes foram incubadas a 32 °C sob um fotoperíodo de 16 horas. Depois de 18-20 semanas, os calos friáveis que não produziram cladódios foram subcultivados em intervalos de 13 dias. Estes calos estão sendo subcultivados por mais de 12 anos no laboratório de cultura de tecidos e eletroforese de vegetais.

Para a obtenção dos polissacarídeos da cultura de calos foi utilizado o procedimento descrito por Machado e colaboradores (2004).



Figura 5. Cultura de calos de *C. pervuvianus*.

FONTE: Tanaka, 2008

Para a extração dos polissacarídeos, fragmentos de tecidos foram triturados no liquidificador com uma pequena porção de água destilada (1:3). Em seguida foram adicionadas três partes de etanol para a precipitação dos polissacarídeos. O material foi deixado em repouso na geladeira por 48 horas

para auxiliar a formação do precipitado. Após esse tempo, os polissacarídeos foram coletados com a ajuda de uma peneira, lavados com etanol e em seguida com acetona. Após seco e liofilizado, o polissacarídeo bruto (PC) foi armazenado no freezer.

Os polissacarídeos obtidos tanto da planta (PP) quanto da cultura de calos (PC), após o procedimento de extração, foram submetidos a um processo de purificação para a retirada dos materiais interferentes, tais como clorofila, fibras e outros metabólitos.

Os materiais submetidos a este processo foram solubilizados em água destilada, congelados e, posteriormente, descongelados à temperatura ambiente, para obter os polissacarídeos solúveis. O precipitado, insolúvel em água fria, foi separado por centrifugação (8.000 rpm / 20 minutos a 10 °C). Esse processo foi repetido diversas vezes, até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado e fosse obtido um sobrenadante límpido. Após essa etapa, os sobrenadantes (S1) e precipitados (P1) foram reunidos, identificados e liofilizados.

Em seguida aos sobrenadantes dos PP e PC foi adicionada uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% de igual volume e a solução resultante foi deixada na geladeira em repouso por 2 horas para a precipitação das proteínas. Após esse período, o precipitado formado foi separado por centrifugação (8.000 rpm / 20 minutos a 10 °C). Esse processo foi repetido diversas vezes, até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado. O precipitado (P2) foi reunido e guardado no freezer e os sobrenadantes foram reunidos, identificados, neutralizados com NaOH 40% e submetidos a diálise fechada em membranas com limite de exclusão entre 8-10 kDa, por um período de 15 dias em um bécker com água destilada, dentro da geladeira. Após esse procedimento os materiais retidos nas membranas de diálise foram concentrados e liofilizados, sendo identificados como PP2 para os polissacarídeos obtidos da planta e PC2 para os polissacarídeos obtidos da cultura de calos.

4.2 Caracterização química dos polissacarídeos

4.2.1 Composição monossacarídica

O processo de hidrólise dos polissacarídeos para a formação dos acetatos de alditóis para a determinação da composição monossacarídica, foi conduzido de acordo com Cipriani (2007) com algumas modificações.

Durante 8 horas, 4 mg dos polissacarídeos, com 1 ml de ácido trifluoracético (TFA) 2 mol/l, foram mantido á 100 °C em banho de glicerina. As soluções foram evaporadas até a secura e o resíduo dissolvido em 1 mL de água destilada, ao qual 4 mg de NaBH₄ foi adicionado. Após 18 horas, o ácido acético foi adicionado e as soluções foram evaporadas até a secura, o ácido bórico resultante foi removido como borato de trimetila, por repetidas evaporações com metanol. Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v; 2 mL), à temperatura ambiente, “overnight”. As reações foram interrompidas com gelo e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio, o qual foi lavado diversas vezes com solução aquosa de CuSO₄ a 5% para a eliminação da piridina residual. A fase clorofórmica foi desidratada com Na₂CO₃ anidro, filtrada e evaporada à temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (SASSAKI *et al.*, 2005)

4.3 Métodos cromatográficos

4.3.1 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas foi realizada em um cromatógrafo Varian Saturn 2000R – 3800 acoplado a um espectrômetro de massas Varian Ion-Trap 2000R, utilizando a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 mL/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis foram analisados a uma temperatura de 50 – 220 °C (40 °C/min).

4.3.2 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar foi realizada em um equipamento Beckman-Coulter, P/ACE MDQ equipado com detector UV em 270 nm, do Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá.

As análises foram realizadas de acordo com Rovio, *et al.* (2008). O capilar revestido com sílica de 50 e 75 μm , com 50/60 cm (comprimento efetivo/comprimento total) foi empregado nos experimentos. Para se iniciar as análises o capilar foi condicionado utilizando uma sequência de lavagem com NaOH 0,1 mol/L, água Milli-Q, e a solução tampão com uma pressão de 0,5 psi durante 20 minutos com cada. Após isso, as amostras foram injetadas a uma pressão de 0,5 psi e o tempo de injeção foi de 6,0 segundos. Entre as análises o capilar foi lavado com a solução tampão por 5 minutos com uma pressão de 20 psi. A voltagem de separação utilizada foi de 17 kV e a temperatura de 20 °C.

As soluções estoque foram preparadas com cada polissacarídeo em uma concentração de 10 mg/L. Foram utilizadas soluções padrão de galactose (5-150 mg/L), glicose (50-400 mg/L) e frutose (50-400 mg/L). Todas as soluções foram armazenadas em refrigerador (4 °C).

4.4 Análise espectroscópica

4.4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H , ^{13}C) foram realizadas em um espectrômetro Bruker DRX 400 Avance com Transformada de Fourier do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. As análises foram realizadas em uma sonda invertida de 5 mm de diâmetro a 50 °C ou 70 °C. As amostras solúveis em água foram dissolvidas em D_2O e as insolúveis em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m., relativa à acetona (δ 30,2) ou ao $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$.

4.5 Análise espectrofotométrica

4.5.1 Dosagem de açúcar total

4.5.1.1 Preparo das amostras

Pesou-se alíquota de 1,0 g de amostra em balança analítica, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água destilada (q.s.p 100 mL). Em seguida dissolveu-se a amostra por completo, e a partir dessa solução utilizou-se 0,1 mL para análise.

4.5.1.2 Estabelecimento da curva padrão

Preparou-se uma solução estoque de glicose, onde pesou-se em balança analítica 250 mg de padrão de glicose, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL usando água deionizada como solvente para completar volume. Pipetou-se 25 mL do padrão, transferiu-se para balão volumétrico de 250 mL usando água deionizada como solvente, sendo essa solução padrão de glicose 0,25 mg/mL utilizada no estabelecimento da curva-padrão para glicose.

Para o estabelecimento da curva-padrão de açúcares totais, numerou-se 7 tubos de ensaio, prosseguindo com diluições.

4.5.2.3 Leitura das amostras e padrões

Para este tipo de análise os reagentes são postos em solução no momento da análise, sendo assim para a análise de glicose. A preparação das soluções padrões e leitura de absorbância de açúcares totais, utiliza 250 mg de do padrão de cada uma, dissolvidos em balão volumétrico de 100 mL, após dissolução pega-se 25 mL de cada solução e transfere-se para outro balão volumétrico e completa-se o volume para 100 mL.

Após a junção de um determinado volume da solução estoque de glicose com 1,0 mL de fenol 5%, e 5 mL de ácido sulfúrico P.A, os tubos de ensaio foram deixados em repouso por 10 minutos, em seguida foram agitados em agitador, e levados ao banho maria, na temperatura de 25 °C – 30° C por 10 minutos, sendo posteriormente lidos em espectrofotômetro em 490 nm.

Para analisar as amostras foram utilizadas alíquotas de 0,1 mL da solução estoque de cada amostra, 1 mL de Fenol 5% e 5 mL de Ácido Sulfúrico P.A., prosseguindo com leitura em espectrofotômetro em 490nm.

4.5.2 Dosagem de proteínas totais

4.5.2.1 Preparo das amostras

Pesou-se alíquota de 1,0 g de amostra em balança analítica, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água destilada (q.s.p 100 mL), em seguida dissolveu-se a amostra por completo, e a partir dessa solução utilizou-se 0,1 mL para análise.

4.5.2.2 Preparo do reagente de biureto

Adicionou 1,5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 6,0 g tartarato de Sódio/Potássio ($\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), em 500 mL de água. Adicionou 300 ml de NaOH 10% e em seguida 1,0 g de iodeto de potássio (KI) de preferência já dissolvido num pequeno volume de água. Ajuste o volume para 1,0 litro.

4.5.2.3 Preparo da albumina de soro bovino (ASB)

Pesou-se 0,05 g de ASB e transferiu para um balão volumétrico com 40 ml de NaOH 1,0 mol/L. Após a solubilização, completou o volume para 50 mL.

4.5.2.4 Estabelecimento da curva padrão

Para o estabelecimento da curva-padrão de proteína total, numerou-se 10 tubos de ensaio, prosseguindo com diluições.

4.5.2.5 Leitura das amostras e padrões

Adicionou-se 1,0 mL das soluções e 4,0 mL do padrão de biureto, prosseguindo com leitura em espectrofotômetro em 550 nm.

4.6 Avaliação das atividades biológicas

4.6.1 Atividade antiúlcera

4.6.1.1 Animais

Foram utilizadas fêmeas de ratos Wistar (180-200 g) mantidas no biotério da Universidade Federal do Paraná sob condições controladas (ciclo de 12 horas luz/escuro, a temperatura de 22 ± 2 °C). Os animais receberam ração na forma de pellet (Nuvital[®], Curitiba/PR, Brasil) e a água foi disponibilizada *ad libitum*. Os animais foram privados de alimentação 24 horas antes dos experimentos.

4.6.1.2 Indução de lesões de úlcera gástrica aguda nos ratos

Os ratos foram tratados oralmente com o veículo (água, 0.1 mL/100 g de peso corporal do animal), omeprazol (40 mg/kg) ou PP2 (10, 30, 100 mg/kg) 1 hora antes da administração intragástrica de etanol P.A. (0.5 mL). Os animais foram sacrificados 1 hora após a administração do etanol (ROBERT *et al.*, 1979). Os estômagos foram removidos e a área da ulceração (mm²) foi medida planimetricamente usando-se o programa *Image Tool 3.0*.

4.6.1.3 Análise estatística da taxa de lesão gástrica

Os dados foram expressos como média \pm erro médio padrão. A significância estatística dos resultados foi determinada usando-se análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados foram considerados diferentes para um nível de significância de $p < 0.05$. O valor da dose efetiva 50% (ED₅₀) foi determinado por regressão não linear usando o software (GraphPad software, San Diego, CA, EUA).

4.6.2 Atividade antiviral

4.6.2.1 Cultivo de células e propagação viral

A avaliação da atividade antiviral foi realizada na Universidade Estadual de Maringá. As células Vero (células de rim de macaco verde africano) foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco[®]) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino - Gibco[®]) e 50 µg/mL de

gentamicina. A cultura foi mantida em garrafas plásticas com tampa de rosca e dispositivo para entrada de CO₂, mantidas em estufa úmida a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ (Fischer Scientific®, modelo Isotemp). As células foram observadas em microscópio invertido (Zeiss®, modelo Axiovert 25) diariamente e o meio trocado quando o pH apresentava-se ácido.

Para a obtenção da suspensão de partículas virais HSV-1, a monocamada de célula foi infectada com o HSV-1 e mantida em estufa a 37 °C até a observação do efeito citopático em mais de 80% das células. Após incubação, o sobrenadante foi centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos, em seguida foi dividido em alíquotas de 150 µL e congelado a -70 °C com 10% de DMSO estéril.

4.6.2.2 Ensaio de toxicidade celular

O ensaio de citotoxicidade dos polissacarídeos foram realizados segundo a técnica colorimétrica da sulforrodamina B descrita por Skehan et al. (1990) com algumas modificações. Células Vero cultivadas em DMEM acrescido de 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina foram distribuídas em microplacas de 96 poços (TTP®) na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ml e incubadas em estufa úmida a 37 °C até a formação da monocamada confluenta. Após 24 horas de incubação, o meio dos poços foi substituído por meio novo e então 100 µL das várias diluições dos compostos foram adicionados aos poços, em triplicatas. No controle de células adicionou-se apenas o meio de cultura. As células foram incubadas em estufa úmida a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ por 72 horas.

Passado este período retirou-se o meio de cultura, os poços foram lavados com PBS e as células viáveis fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético (Synth®) 10% a 4 °C por 1 hora. A placa foi lavada 4 vezes em água corrente e 50 µl de uma solução de sulforrodamina B 4% (Sigma®) em ácido acético 1%. Após incubação de 30 minutos a 4 °C ao abrigo da luz, o corante foi removido por 4 lavagens com ácido acético 1%. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µL de solução Tris-base 10 mmol/L;. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Bio- Tek, modelo Power XS) em 530 nm.

Os resultados foram comparados com o controle de células e a citotoxicidade foi determinada pela destruição celular propiciada pelos compostos.

4.6.2.3 Titulação viral

Células Vero foram cultivadas em placas de 96 poços, conforme descrito acima. Após período de incubação, o meio foi retirado de cada poço e lavado com 100 µL de meio DMEM para remover os resíduos de SFB que interferem na adsorção viral. Em seguida, 25 µL de várias diluições do vírus (de 10^{-1} a 10^{-6}) foram adicionados aos poços em quadruplicata, deixando alguns poços sem vírus para controle negativo. A placa foi incubada durante 1 hora a 37 °C para que ocorresse a adsorção viral. Após período de incubação, foi adicionado em cada poço 175 µL de DMEM e 50 µL/mL de gentamicina.

A placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ durante 72 horas. Em seguida, o meio dos poços foi removido, o tapete lavado com PBS e fixado com ácido tricloroacético à 10% (SYNTH®) no volume de 50 µL/poço por 1 hora sob refrigeração e ao abrigo de luz. A placa foi lavada 4 vezes em água corrente e mantida em temperatura ambiente até secar. Em cada poço foi adicionado 50 µL de uma solução de sulforodamina B 4% (Sigma®) em ácido acético 1%, a placa foi incubada novamente por 30 minutos sob refrigeração ao abrigo da luz. Retirou-se o corante da placa e lavou-se 4 vezes com ácido acético glacial à 1% para remoção do corante em excesso. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µL de solução Tris-base 10 mmol/L. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Bio-Tek®, modelo Power Wave XS) em 530 nm.

Cálculos foram realizados para determinar o título viral capaz de destruir 80% da monocamada celular (TCID₈₀), o qual foi utilizado nos experimentos de atividade antiviral por este método.

4.6.2.4 Atividade antiviral

Após a formação da monocamada confluyente em placas de 96 poços como descrito acima, as células lavadas com PBS e infectadas com 25 µL de suspensão de HSV-1 TCID 80 (Tissue Culture

Infectious Dose-título viral capaz de destruir 80% da monocamada) por 1 hora a 37 °C. Após este período (adsorção viral) adicionou-se 75 µL de meio contendo gentamicina e em seguida foi adicionado 100 µL das várias diluições dos compostos, em triplicatas. As células foram incubadas em estufa úmida a 37 °C por 72 horas. Controle de células (sem adição de partículas virais ou compostos) e controle de vírus (sem a adição dos compostos) foi realizado. A fixação, coloração e leitura da absorbância foram feitas conforme descrito anteriormente (item 4.6.2.2). Os resultados foram comparados com os controles de células e vírus e a atividade antiviral determinada pela porcentagem de inibição do efeito citopático propiciado pelos compostos.

4.6.3 Atividade antiinflamatória

4.6.3.1 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de TPA (12-O-tetradecanoilforbolacetato)

Esta é uma metodologia que permite a observação do efeito sistêmico da substância teste pela indução de um estímulo inflamatório local, sendo realizada na Universidade Federal do Paraná. Um dos constituintes ativos do óleo de cróton é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), um éster de forbol que induz inflamação. O TPA é um ativador direto de diversas isoformas da proteína quinase C, que por sua vez ativa outros grupos de enzimas como as fosfolipases e MAP quinases. A ativação das MAP quinases por sua vez, induz a ativação de fatores de transcrição nuclear como o NF-κB e o AP-1, os quais regulam a produção de diversas proteínas pró-inflamatórias (SANCHEZ e MORENO, 1999; SHOLZEN *et al.*, 2003). Todavia, o mecanismo pelo qual o TPA causa inflamação ainda não está completamente claro, mas parece também estar relacionado, em parte, com a liberação de eicosanóides. Inibidores da biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas têm se mostrado ativos neste modelo. Já é bem estabelecido que o TPA estimula a fosfolipase A₂, resultando na liberação de ácido araquidônico e conseqüentemente a produção de prostaglandinas e leucotrienos (principalmente LTB₄) (GÁBOR, 2000).

O edema é induzido pela administração intraplantar (i.pl.) de TPA (50 pmol/pata, i.pl.) na pata traseira direita dos camundongos (CASTARDO *et al.*, 2008 adaptado de LEVY, 1969). A espessura da pata traseira dos animais foi avaliada com o uso de um micrômetro digital (GREAT, MT – 04513), sendo essa a medida basal. Em seguida, para avaliar o efeito dos polissacarídeos e dos extratos, os mesmos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes da administração do TPA, respectivamente. Outro grupo de animais foi tratado com dexametasona (1 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes da indução do edema (grupo controle positivo). Após 30 minutos, os animais receberam 50 µl de TPA (50 pmol/pata) (FERREIRA *et al.*, 2005). O edema foi avaliado 1 hora após a aplicação do TPA. Os resultados são expressos como a diferença entre a espessura da pata final e a espessura antes da injeção de TPA (basal). Tanto o TPA quanto as drogas foram dissolvidos em solução salina.

4.6.3.2 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA

A aplicação repetida de TPA em orelhas de camundongos causa resposta inflamatória crônica caracterizada por edema, infiltração predominante de células mononucleares e hiperproliferação celular na epiderme (STANLEY *et al.*, 1991). O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha direita de camundongos. Os polissacarídeos e os extratos foram administrados por via i.p. (100 e 300 mg/kg), e 30 min depois, o TPA foi aplicado topicamente. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 6 horas após a aplicação do agente flogístico (DE YOUNG *et al.*, 1989). Nesse modelo o TPA foi dissolvido em acetona e aplicado em um volume de 20 µL.

4.6.3.3 Drogas

Dexametasona e 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) foram obtidos da Sigma, Chemicals & Co, EUA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e purificação

Os polissacarídeos das partes aéreas de *C. peruvianus* (Mandacaru) foram extraídos das hastes frescas, retirados os espinhos e a medula, utilizando assim o parenquima aquoso, a cera epicuticular, cutícula e o núcleo cilíndrico (ALVAREZ *et al.*, 1992), como mostram a Figura 6.

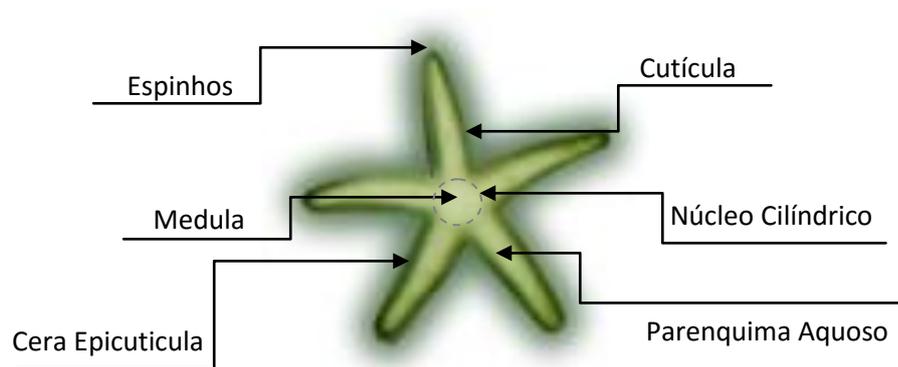


Figura 6. Estrutura das hastes de *C. peruvianus*.

Após a retirada dos espinhos e da medula, as demais partes utilizadas foram trituradas no liquidificador com uma parte de água para 03 partes de etanol. O precipitado retirado, lavado com etanol e acetona, sendo liofilizado em seguida. A partir de cada 100 g de planta foram obtidos aproximadamente 2,5% do polissacarídeo bruto (PP), em relação a planta *in natura*.

Apesar da cultura de calos de *C. peruvianus* ser uma massa desorganizada, ela apresentou praticamente a mesma proporção de polissacarídeo bruto (PC), sendo de 2,48%, após a sua extração com água e precipitação com etanol.

Para o processo de congelamento/degelo e tratamento com TCA utilizou-se 0,5 g de cada amostra obtendo-se ao final 19,08% de PP2 e 18,24% de PC2 (polissacarídeos parcialmente purificados da planta e do calo, respectivamente).

A Figura 7 mostra o esquema da extração e purificação dos polissacarídeos obtidos das partes aéreas de *C. peruvianus* e da cultura de calos. O procedimento de precipitação com TCA 20% foi

realizado com objetivo de se eliminar as proteínas presentes na amostra e o procedimento de congelamento e degelo foi para separar polissacarídeos com diferenças significativas de solubilidade em água fria.

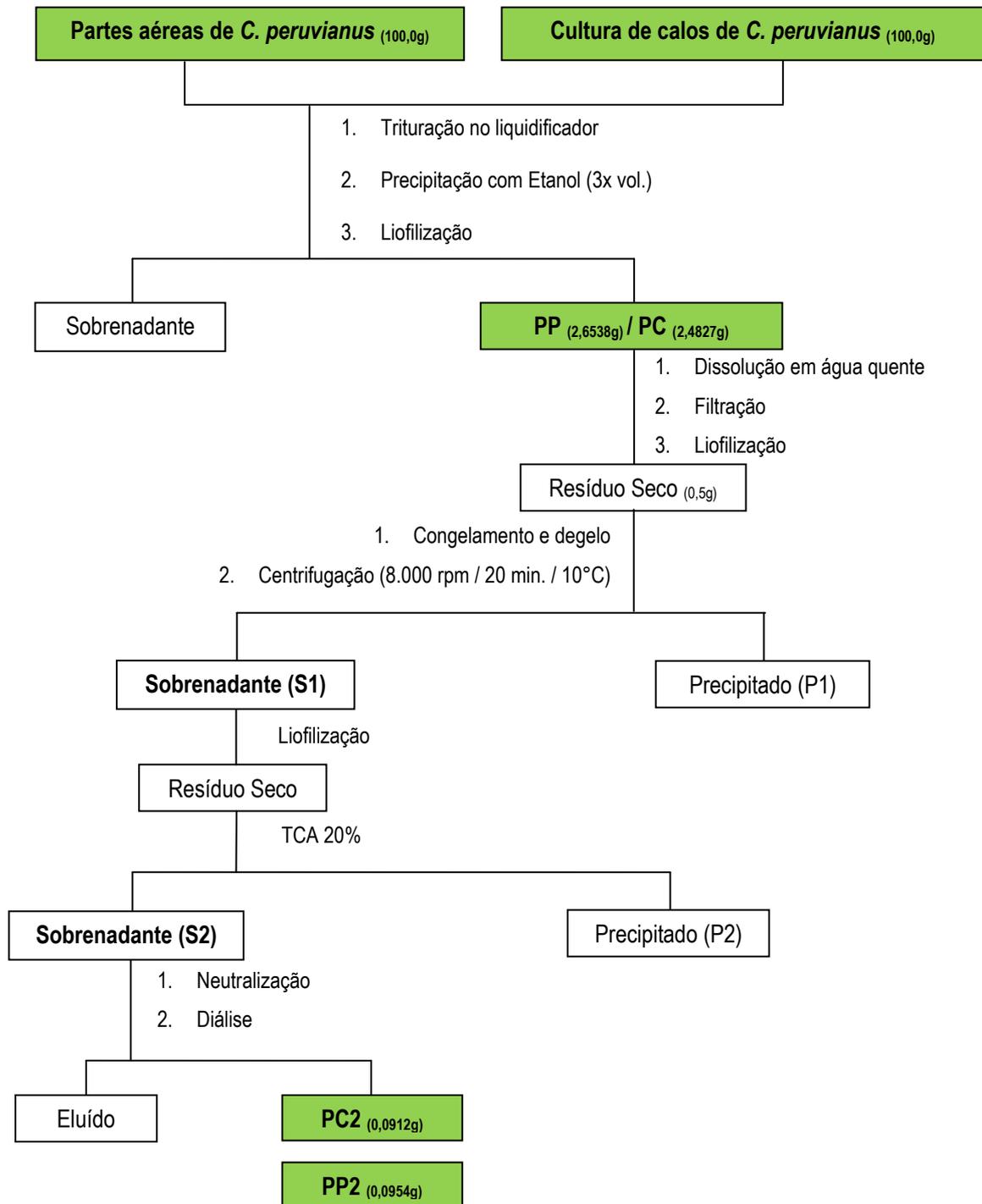


Figura 7. Fluxograma do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos das partes aéreas e da cultura de calos de *C. peruvianus*.

Na tabela a seguir são mostradas as quantidades de açúcares e de proteínas totais das amostras obtidas a extração após o procedimento de purificação:

Tabela 2. Quantificação de açúcares totais e proteínas totais das amostras.

Amostra	Proteínas Totais (%)	Açúcares Totais (%)
PP	4,45	5,41
PP2	0,10	24,97
PC	0,50	24,91
PC2	0,12	30,41

Pelos resultados, verifica-se que uma vez que os calos se apresentaram como uma massa celular e não como tecidos organizados como em uma planta desenvolvida, a quantidade de proteínas é mais baixa. Além disso, a quantidade de açúcares totais ocorre em um valor muito próximo do valor obtido pelas análises do PP2.

O método de purificação permitiu a redução na concentração de proteínas tanto para o PC (de 0,5% para 0,12%), quanto para o PP (de 4,5% para 0,1). No trabalho de Mellinger (2006) com *Phyllanthus niruri* (Quebra-Pedra) a concentração das proteínas foi de 10% para o extrato obtido por decocção e de 30% para o extrato por infusão. Já segundo Davet (2005) o *C. jamaru* chega a possuir 10,72% de proteína bruta. Nas sementes de *Opuntia ficus-indica* (CHIACCHIO, MESQUITA e DOS SANTOS, 2006), obteve-se 16,6% e na polpa do fruto de 0,21%.

Após a purificação ambas as amostras apresentaram um aumento na porcentagem de açúcares, chegando a 24,97% para o PP2 e de 30,41% para o PC2. No trabalho realizado por Sutovská e colaboradores (2009), após a extração aquosa dos polissacarídeos de *Trichilia emetica* Vahl. (Meliaceae) obteve-se aproximadamente 40% de carboidratos. Ao se estudar a extração etanol:água (1:1) de *Crossopteryx febrifuga* Benth. (Rubiaceae) os mesmos autores mostram que o extrato contém apenas 15% de carboidratos. Já ao se investigar a polpa do fruto da *Opuntia ficus-*

indica (CHIACCHIO, MESQUITA e DOS SANTOS, 2006), obteve-se 11% de açúcares totais, resultado igual ao da polpa de laranja.

5.2 Caracterização estrutural

Segundo Rovio e colaboradores (2008) a composição de carboidratos dos polissacarídeos de diferentes origens pode ser determinada após a liberação dos monossacarídeos por hidrólise, com ácidos ou enzimas. Os monossacarídeos livres podem ser separados e quantificados por cromatografia gasosa (CG) após derivatização química e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Recentemente a eletroforese capilar (EC) vem sendo introduzido para quantificar carboidratos neutros.

Através dos eletroferogramas (Figura 8) obtidos tanto dos padrões de monossacarídeos como da mistura de padrões, não se obteve a detecção dos monossacarídeos, isso provavelmente por causa do detector e do comprimento de onda utilizado, que é diferente da metodologia. Assim, não foi realizado um teste com as amostras de *C. peruvianus*. O pico que aparece provavelmente é algum tipo de interferente.

Já Rovio e colaboradores (2008), em aproximadamente 30 minutos obteve um eletroferograma da separação de uma mistura de monossacarídeos. Mostrando que a detecção por UV em um comprimento de onda de 270nm é sensível a diversos carboidratos como: galactose, glicose, ramnose, manose, arabinose e xilose. Eles observaram que as pentoses migram depois das hexoses.

A metodologia utilizada por Lamb e colaboradores (2005) ao analisar polissacarídeos meningocócicos nativos, mostra que a eletroforese capilar é um método rápido e capaz de determinar os quatro sorotipos do antígeno (Y, W135, C e A) em uma única análise. Além disso, a revisão realizada por Nishi e Kuwahara (2001) mostra que por eletroforese capilar é possível identificar e separar polissacarídeos, inclusive seus enantiômeros.

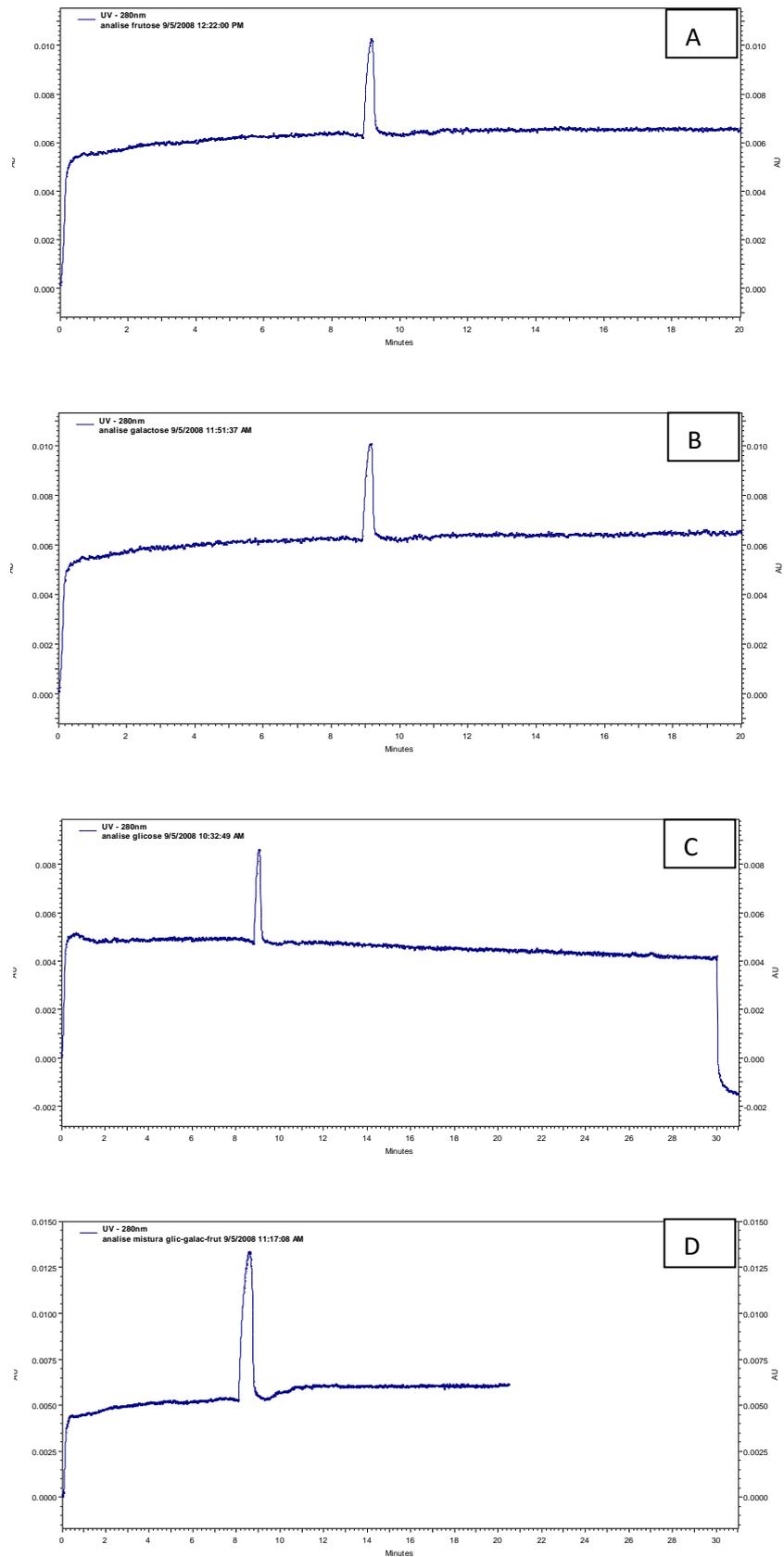


Figura 8. Eletroferogramas dos padrões frutose (A), galactose (B), glicose (C) e da mistura (D).

Pode se observar, através dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 10), que existem diferenças entre os polissacarídeos que constituem as amostras POLIP-CP e POLIC-CP na região característica dos carbonos anoméricos (δ 95-110 ppm).

O espectro de RMN ^{13}C do PP (Figura 9A) mostrou sinais de deslocamento em δ 104,3 (C-1), 77,5 (C-4), 74,4 (C-5), 73,3 (C-3), 71,9 (C-2) e 60,7 (C-6) típico de uma arabinogalactana com uma cadeia principal constituída por unidades de galactose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4) (Cipriani *et al.*, 2004; Cipriani *et al.*, 2009). Ainda que o PP contenha 6% de ácido galacturônico, não foi observado nenhum sinal para grupos carboxila na região de δ 174,0-175,0, devido às condições espectrais empregadas. A presença do $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -6 das unidades de Rhap foi evidenciada pelo sinal em δ 16,9 (Gorin e Mazurek, 1975). Os sinais do C-1 das unidades de α -L-Araf estão presentes em δ 109,2, 107,6 e 107,4.

O espectro de RMN ^{13}C do PC (Figura 9B) mostrou sinais a δ 101,9 (C-1), 79,6 (C-4), 76,9 (C-5), 75,1 (C-3), 74,9 (C-2) e 60,9 (C-6) típico de uma arabinogalactana com uma cadeia principal de galactose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4) (Habibi *et al.*, 2005).

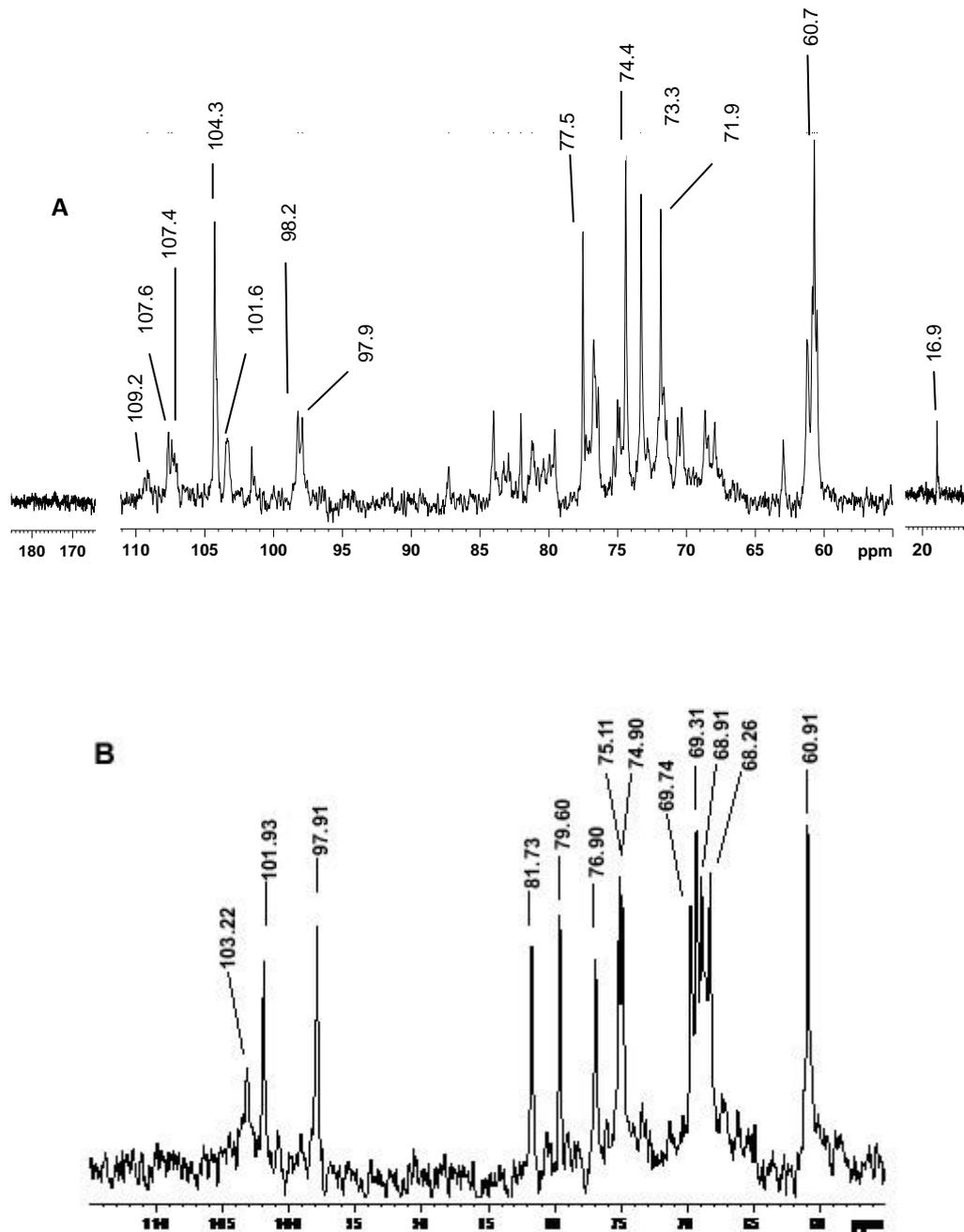


Figura 9. (A) Espectro de RMN ^{13}C (100,61 MHz, D_2O) dos polissacarídeos obtidos das partes aéreas da planta. (B) Espectro de RMN ^{13}C (100,61 MHz, D_2O) dos polissacarídeos obtidos da cultura de calos.

Com relação aos espectros de RMN ^1H (Figura 10), notou-se algumas semelhanças, mas com diferenças na região entre 2-3 ppm e 5-6 ppm (região dos hidrogênios anoméricos).

O espectro de RMN ^1H de PP (Figura 10A) permitiu atribuir os sinais em δ 5,0-5,4 e 4,5-4,6, aos prótons anoméricos dos resíduos da α -Araf e β -Galp, respectivamente. Os sinais de H-1 da α -Rhap

e do α -GalpA estão em δ 5,29 e 5,08/4,95 respectivamente. O sinal em δ 1,22 ppm correspondem ao H-6 do grupo CH₃ da unidade ramnopiranosil (Cui *et al.*, 1996; Habibi *et al.*, 2005).

O espectro de RMN ¹H de PC (Figura 10B) permitiu atribuir os sinais em δ 5,0-5,4 e 4,55 aos prótons anoméricos dos resíduos da α -Araf e β -Galp.

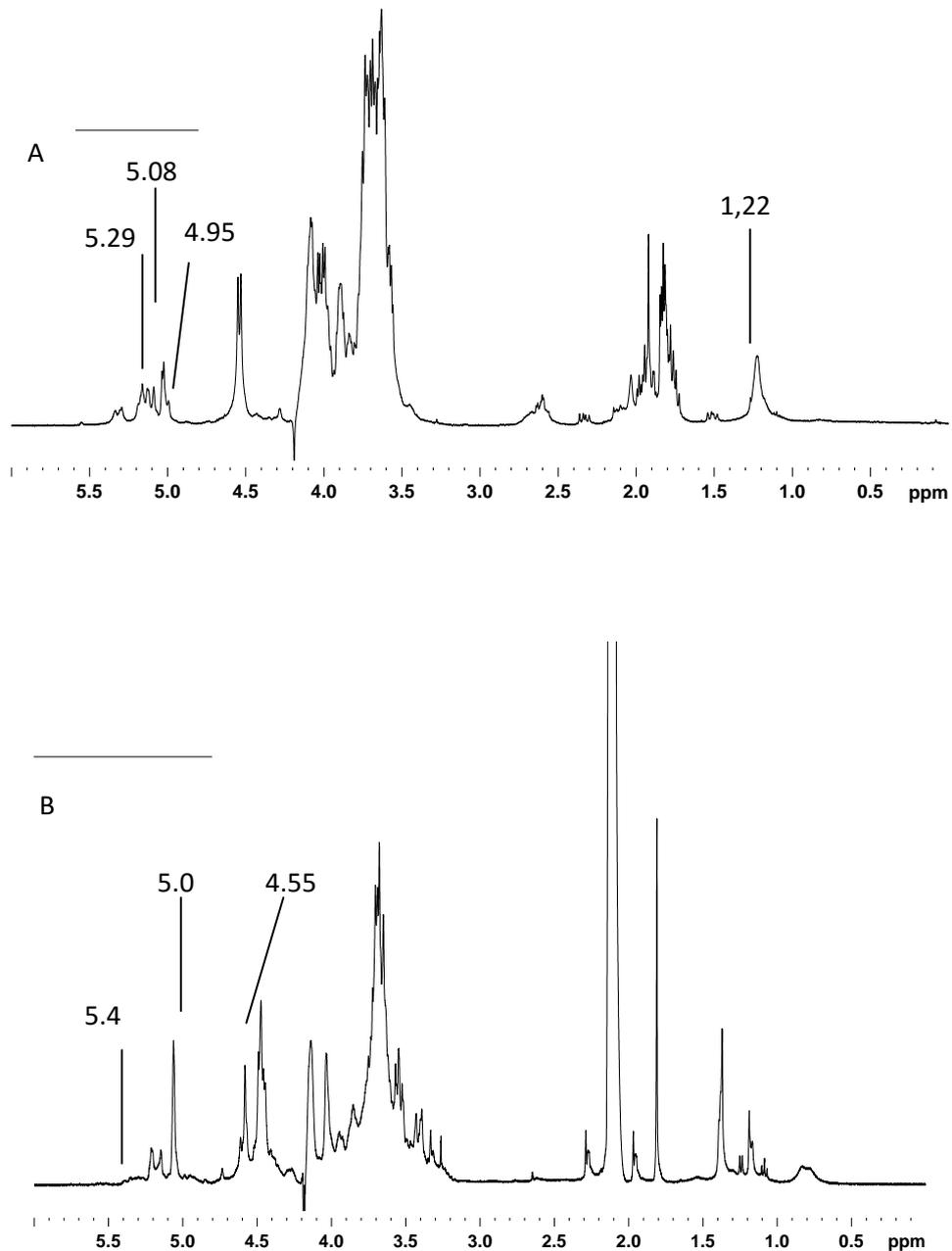


Figura 10. (A) Espectro de RMN ¹H (400,13 MHz, D₂O) de PP. (B) Espectro de RMN ¹H (400,13 MHz, D₂O) de PC.

O espectro de RMN ^1H de ambos polissacarídeos apresentaram vários sinais presentes na região entre δ 4,4 e 5,5, mostrando a complexidade da estrutura. Como os núcleos de carbono apresentam sinais mais resolvidos, de frequências características e de atribuição mais simples, análises futuras utilizando a técnica de correlação heteronuclear HSQC, objetivando identificar as ressonâncias dos hidrogênios anoméricos e separá-las daquelas dos demais hidrogênios devem contribuir para a caracterização precisa dos polissacarídeos. As regiões de ressonância dos hidrogênios e carbonos anoméricos são, respectivamente, δ_{H} 4,4-5,5 e δ_{C} 90-105 (MAGATON, PILÓ-VELOSO e COLODETTE, 2008), região onde podemos notar as diferenças entre os polissacarídeos testados.

5.3 Atividade antiúlcera

Para determinar se o polissacarídeo purificado das partes aéreas de *C. peruvianus* (PP2) tinha atividade antiúlcera, um tratamento oral com 10, 30 e 100 mg/kg foram testado em um modelo *in vivo*. POLIP-CPP reduziu a área de lesão gástrica induzida por EtOH P.A. com uma ED_{50} = 49.0 mg/kg. O Controle positivo utilizado, omeprazol (40 mg/kg, p.o.) também inibiu a lesão gástrica em $35 \pm 8\%$ (Figura 11).

Já no trabalho realizado com as folhas de *Maytenus ilicifolia* (CIPRIANI *et al.*, 2006), com o tratamento oral da arabinogalactana com 10 e 30 mg/kg apresentou uma redução da área de lesão gástrica com ED_{50} de 9.3 mg/kg, utilizando etanol 45 e 81%. Segundo os autores o pré-tratamento com arabinogalactana sugere uma capacidade da arabinogalactana como agente citoprotetor direto. Possivelmente mecanismos para o efeito gastroprotetor dos polissacarídeos como: uma camada protetora pela habilidade destes polímeros de se ligar à superfície da mucosa gástrica; atividade anti-secretora de suco gástrico; proteção da mucosa pelo aumento da síntese de muco; e seqüestro de radicais livres.

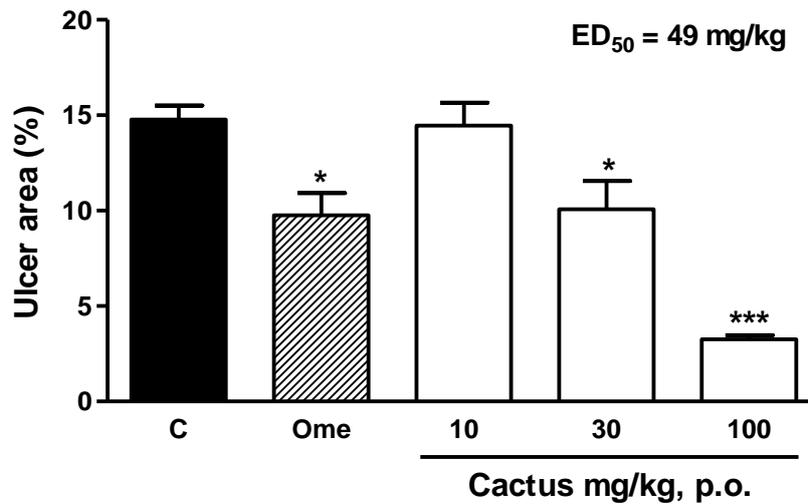


Figura 11. Efeito protetivo do POLIP-CPP testado com doses de 10, 30, e 100 mg/kg, *v.o.*, contra lesões gástricas induzidas por etanol (C: controle, água 0.1 ml/100 g, *v.o.* e Ome: omeprazole 40 mg/kg, *v.o.*). Os resultados são expressos como média \pm erro médio padrão ($n = 6$). A comparação estatística foi realizada usando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com o grupo controle.

5.4 Atividade antiviral

A incidência global de doenças causadas por vírus, como o HIV, é bastante significativa na população mundial. Estima-se que milhões de indivíduos em todo o mundo sejam acometidos por algumas das doenças causadas por este vírus. Sendo assim, estudos que visem o controle de propagação e manifestação de tais doenças, além da inativação destes patógenos, seriam de grande interesse (SILVA, 2009).

Após a obtenção das amostras PP e PC, ambas foram testadas para verificar a atividade antiviral contra HSV-1, em culturas de células Vero, revelado pelo método colorimétrico da sulforodamina B.

Para ser um fármaco antiviral ideal ele deve inibir somente a(s) etapa(s) do ciclo de replicação viral, não interferindo na célula hospedeira, possibilitando que ela se recupere da infecção. Para se encontrar um novo fármaco antiviral de origem natural ou sintética, deve-se observar seus efeitos tóxicos sobre as células (SILVA, 2009).

Os dados descritos na Tabela 3 permitem avaliar o potencial citotóxico das amostras (PP e PC). Ambas não apresentaram toxicidade a 50% das células nas concentrações testadas, desta forma o CC_{50} das substâncias apresentou-se maior que 500 $\mu\text{g/mL}$. Os trabalhos realizados por Zhu et al. (2006) e Talarico et al. (2004), também mostram que é necessário uma alta concentração do polissacarídeo para que a citotoxicidade em células Vero atinja 50%.

Tabela 3. Avaliação da citotoxicidade dos polissacarídeos extraídas da cultura de calos (PP) e do cacto (PC).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	PP	PC	Aciclovir
500	33,03%	46,10%	-3,11%
250	29,74%	45,06%	-1,92%
125	24,93%	38,29%	-1,79%
62,5	23,95%	22,90%	-0,65%
31,25	13,48%	11,40%	-0,79%
15,6	18,14%	18,10%	-0,49%

Quando se investigou a atividade anti-HSV-1 das amostras foi possível observar um EC_{50} (dose efetiva para proteger 50% da monocamada de células Vero) de aproximadamente de 16 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as amostras (PP /PC). O mesmo teste foi realizado com o aciclovir, uma droga padrão utilizada no tratamento do HSV-1, seu EC_{50} foi de 10 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com os resultados obtidos, podemos considerar as amostras como possíveis fármacos a serem investigadas de maneira detalhada no tratamento do HSV-1 (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da atividade antiviral das amostras POLIC-CP e POLIP-CP.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	PP	PC	Aciclovir
100	13,15%	62,77%	100,00%
50	64,80%	56,50%	80,85%
25	70,82%	63,82%	51,79%
10	33,57%	42,87%	50,09%
1	33,13%	7,99%	16,53%
0,1	64,43%	20,82%	13,11%

Não foi possível obter o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/EC_{50}$), pois não se obteve o CC_{50} dos polissacarídeos, sugerindo que o mesmo será alto, uma vez que não foi possível obter o CC_{50} na maior concentração testada.

Após a obtenção das amostras PP2 e PC2, novos testes foram realizados para verificar a atividade antiviral contra HSV-1, em culturas de células Vero, revelado pelo método colorimétrico da sulforodamina B.

O potencial citotóxico das amostras continuou alta. Assim sendo, os compostos atendem a um dos requisitos para ser um fármaco antiviral ideal, não sendo tóxico para a célula. Contudo, os compostos não apresentaram atividade antiviral na maior concentração testada, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Avaliação da atividade antiviral das amostras PP2 e PC2.

Compostos	CC 50 µg/ ml	EC50 µg/ ml	IS
PP2	440.00 ± 59.22	> 100	n.d
PC2	483.33 ± 56.25	> 100	n.d

n.d.: não determinado.

De acordo com Camargo-Filho e colaboradores (2008), muitas proteínas de diversos tamanhos têm sido descobertas de diversas fontes, possuindo um espectro amplo de atividade antimicrobiana, podendo incluir uma capacidade de matar ou neutralizar bactérias, fungos, parasitas e até mesmo vírus envolvidos, como o HIV e o vírus herpes simplex. Isto pode explicar a atividade encontrada no primeiro teste com as amostras PP e PC, mas não com os polissacarídeos semi-purificados (PP2 e PC2). Assim, a atividade antiviral não está relacionada com os polissacarídeos, mas sim com os polissacarídeos associados as proteínas ou mesmo as proteínas isoladamente.

Ainda segundo Carvalho e colaboradores (2010) a ação farmacológica dos metabólitos secundários pode derivar da capacidade deles de formarem complexos com proteínas e polissacarídeos. Mesmo a própria combinação entre proteína e polissacarídeos acaba gerando a atividade biológica (FUJIMIYA *et al.*, 1998; MANTOVANI *et al.*, 2006).

5.5 Atividade antiinflamatória

Quando administrados pela via intraperitoneal, os polissacarídeos foram capazes de alterar o edema de orelha causado pela administração tópica de TPA (Figura 12). O polissacarídeo obtido das partes aéreas de *C. peruvianus* (PP) inibiu a formação de edema em $29 \pm 5\%$ e o polissacarídeo obtido a partir dos calos de *C. peruvianus* (PC) em $51 \pm 8\%$, de maneira semelhante o corticóide dexametasona, utilizado como controle positivo, inibiu em $79 \pm 11\%$.

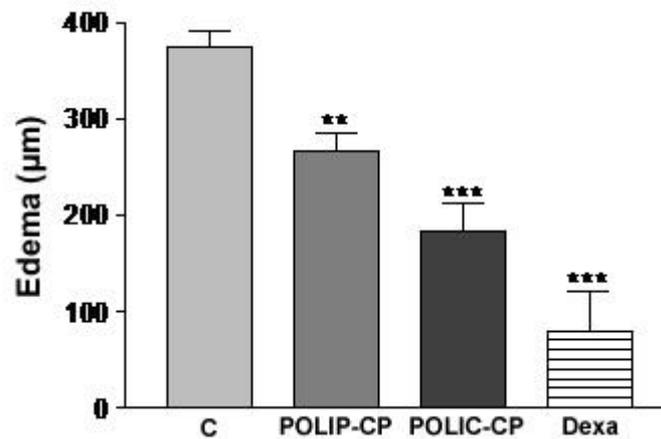


Figura 12. Efeito dos polissacarídeos (100 mg/kg) e da dexametasona (dexta) (1 mg/kg) aplicados por via intraperitoneal no edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/20 µl/orelha). As barras verticais representam a média \pm E.P.M. (n=5). Os asteriscos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

No modelo de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de TPA, apenas o PP e a dexametasona foram capazes de inibir a formação de edema, demonstrando inibição de $37 \pm 9\%$ e $34 \pm 3\%$, respectivamente (Figura 13).

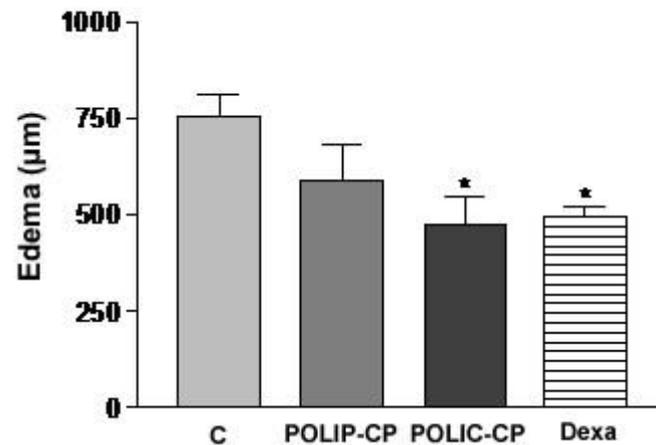


Figura 13. Efeito dos polissacarídeos (100 mg/kg) e da dexametasona (dexa) (1 mg/Kg) aplicados por via intraperitoneal no edema de pata induzido pela aplicação subplantar de TPA (50 pmol/50 µl/pata). As barras verticais representam a média \pm E.P.M. (n=5). Os asteriscos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). * $p < 0,05$.

KWEON e colaboradores (2003) avaliando o efeito do tratamento com o complexo hidrossolúvel quitosana/ heparina em feridas cutâneas em ratos, observaram que no 15º dia de pós-operatório, as feridas estavam completamente cicatrizadas com aspecto similar à pele normal. No trabalho realizado por Ananthi e colaboradores (2010) com a alga marrom *Turbinaria ornata*, a administração oral (concentrações de 2,5, 5, 10, 20 mg/kg) do polissacarídeo obtido reduziu consideravelmente o edema no experimento de edema de pata.

Polissacarídeos como a quitina e a quitosana, vêm sendo utilizados com fins terapêuticos em medicina veterinária, pois atuam como agente cicatrizante e possuem um efeito analgésico (SENEL e McCLURE, 2004).

6 CONCLUSÃO

As análises realizadas para a caracterização comparativa dos polissacarídeos obtidos da cultura de calos e das partes aéreas de *C. peruvianus* mostraram que os métodos de cultivo, revelam diferenças evidentes no seu peso molecular e composição monossacarídica.

Pode se observar, pelos espectros de RMN ¹³C e de RMN ¹H, que as diferenças entre os polissacarídeos que constituem as amostras estão na região característica dos carbonos e hidrogênios anoméricos e as diferenças principais decorrem da complexidade da estrutura do PP e da maior simplicidade do PC.

O potencial citotóxico dos polissacarídeos (PP e PC) foi avaliado e ambos não apresentaram toxicidade a 50% das células nas concentrações testadas, sugerindo que o CC₅₀ das substâncias seja maior que 500 µg/mL. A atividade anti-HSV-1 foi de aproximadamente de 16 µg/mL para ambas as amostras.

Ao se realizar os estudos com os polissacarídeos purificados (POLIP-CCP e o POLIC-CCP), as amostras continuaram apresentando um alto CC₅₀, de 440.00 ± 59.22 µg/mL e 483.33 ± 56.25 µg/mL, respectivamente. Contudo, as amostras não apresentaram atividade antiviral talvez porque a atividade se deva a uma proteína ou por um complexo proteína-polissacarídeo, que foi perdida após a purificação das amostras.

Ao se avaliar a atividade antiinflamatória os polissacarídeos foram capazes de alterar o edema de orelha, o PP inibiu a formação de edema em 29 ± 5% e o PC em 51 ± 8%. Contudo, apenas o PP foi capaz de alterar o edema de pata, inibindo a formação de edema em 37 ± 9%.

Para o teste da inibição das lesões gástricas apenas o PP reduziu a área da lesão induzida por etanol, apresentando um ED₅₀ de 49.0 mg/kg.

Assim, através dos resultados obtidos das atividades biológicas, pode-se sugerir o uso dos polissacarídeos purificados ou do extrato bruto hidro-alcoólica obtidos das partes aéreas das plantas como um fitoterápico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTESOR, A; EZCURRA, H. Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. **Journal of Arid Environment**, v. 53, p. 557-557, 2003.
- ALVAREZ, M; COSTA, S. C; HUBER, A; BARON, M; AND FONTANA, J. D. The cuticle of the cactus *Cereus peruvianus* as a source of a homo-D-galacturonan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51/52, p. 367-377, 1995.
- ALVAREZ, M; COSTA, S.C; UTUMI, H; HUBER, A; BECK, R; FONTANA, J.D. The anionic glycan from the Cactus *Cereus peruvianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 283-295, 1992.
- ANDERSON, E. F. **The Cactus Family**. Timber Press: Oregon. p. 142-150, 2000.
- ANDRADE, C. T. S; MARQUES, J. G. W; ZAPPI, D. C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 36-42, 2006.
- ARIKAT, N. A; JAWAD, F. G; KARAM, N. S; SHIBLI, R. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 193-202, 2004.
- ARRUDA, V. M. **Avaliação farmacológica das atividades antiinflamatória, analgésica e anti-ulcerogênica do fitoterápico Sanativo®**. Pernambuco: 2008. Dissertação (Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Pernambuco.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 143.
- BAGAL-KESTWAL, D; KARVE, M. S; KAKADE, B; PILLAI, V. Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 4, p. 657-664, 2008.
- BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v. 94, p. 557-572, 1998.
- BARRETO, D. W; PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 287-291, 2006.
- BARROS, M. J; NOZAKI, J. Redução de poluentes de efluentes das indústrias de papel e celulose pela floculação/coagulação e degradação fotoquímica. **Química Nova**, v. 25, p. 736-740, 2002.
- BARTHLOTT, W; HUNT. D. R. Cactaceae. In: **The families and genera of vascular plants, v. II flowering plants – Dicotyledons**. KUBIZTKI, K; ROHWER, JG; BITTRICH, V. Berlin: Springer-Verlag, p. 161-197, 1993.
- BOHN, J. A.; Be MILLER, J. N. 1→3 β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3-14, 1995.
- BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 281-286, 2004.
- BRANDÃO, E.M.; ANDRADE, C.T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**, v.9, n.3, p. 38-44, 1999.
- BRECKER, L; WICKLEIN, D; MOLL, H; FUCHS, E. C; BECKER, W. M; PETERSEN, A. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pratense* L.). **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 657-663, 2005.

- BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, v. 124, p. 507-514, 2000.
- BRITTON, N. L; ROSE, J. N. **The Cactaceae - Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family, v. 1**. The Carnegie Institution of Washington: Washington, 1919.
- BUCKERIDGE, M. S; SANTOS, H. P; TINÉ, M. A. S. Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Physiology and biochemistry**, v. 32, n. 1-2, p. 141-156, 2000.
- CAMARGO-FILHO, I; CORTEZ, D. A. G; UEDA-NAKAMURA, T; NAKAMURA, C. V; DIAS FILHO, B. P. Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 202-208, 2008.
- CAPEK, P; HRIBALOVA, V; SVANDOVA, E; SASINKOVA, V; MASAROVA, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 113-119, 2003.
- CASTARDO, J. C; PRUDENTE, A. S; FERREIRA, J; GUIMARÃES, C. L; MONACHE, F. D; CECHINEL FILHO, V; OTUKI, M. F; CABRINI, D. A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-411, 2008.
- CECHINEL FILHO, V; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 18-44.
- CELOTTI, F; LAUFER, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. **Pharmacol Research**, v. 43, p. 429-436, 2001.
- CHI, A.-P; CHEN, J.-P; WANG, Z.-Z; XIONG, Z.-Y; LI, Q.-X. Morphological and structural characterization of a polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino and its anti-exercise fatigue activity. **Carbohydrate Polymers**, v.74, p. 868-874, 2008.
- CHIACCHIO, F. P. B; MESQUITA, A. S; DOS SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o Semi-árido baiano. **Revista Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, p. 39-49, 2006.
- CHIDAMIAN, C. **The Book of Cacti and Other Succulents**. Timber Press: Oregon. p. 25-61, 1984.
- CIPRIANI, T. R. **Polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-Santa) com atividade gastroprotetora**. Curitiba: 2007. 95 f. Tese (Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CIPRIANI, T. R; MELLINGER, C. G; BERTOLINI, M. L. C; BAGGIO, C. H; FREITAS, C. S; MARQUES, M. C. A; GORIN, P. A. J; SASSAKI, G. L; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, p. 687-690, 2009.
- CIPRIANI, T. R; MELLINGER, C. G; GORIN, P. A. J; IACOMINI, M. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 703-706, 2004.
- CIPRIANI, T. R; MELLINGER, C. G; SOUZA, L. M; BAGGIO, C. H; FREITAS, C. S; MARQUES, M. C. A; GORIN, P. A. J; SASSAKI, G. L; IACOMINI, M. A polysaccharide from a Tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1018-1021, 2006.
- COS, P; VLIETINCK, A. J; BERGHE, D.V; MAES, L. Antiinfective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethno-pharmacology**, article in press, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

- COVIELLO, T; MATRICARDI, P; MARIANECCI, C; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 5-24, 2007.
- CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. Disponível em http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf, acessado em 28/11/2009.
- CUNHA, M. A. A; DOS SANTOS, J. C; GÓMEZ R. J. H. C; DA SILVA, S. S. Goma curdlana: propriedades e aplicações. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 55-61, 2004.
- CUNHA, P. L. R; PAULA, R. C. M; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.
- DA SILVA, B. P; PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 887-893, 2001.
- DA SILVA, B. P; PARENTE, J. P. Chemical properties and antiinflammatory activity of a galactomannoglucan from *Arecastrum romanzoffianum*. **Phytochemistry Letters**, 2010.
- DAVET, A. **Estudo fitoquímico e biológico do cacto – *Cereus jamacaru* de Candolle, Cactaceae**. Curitiba: 2005. 100 f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) – Setor da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 679, 1990.
- DE YOUNG, L. M; KHEIFETS, J. B; BALLARON, S. J; YOUNG, M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Inflammation Research**, v. 26, n. 3-4, 1989.
- DELGOBO, C. L; GORIN, P. A. J; JONES, C; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharides and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.
- DELGOBO, C. L; GORIN, P. A. J; TISCHER, C. A; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharides, **Carbohydrate Research**, v. 99, p. 41-50, 1999.
- DEMBITSKY V. M; REZANKA T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1075-1080, 1996.
- DIALLO, D; PAULSEN, B. S; LILJEBACK, T. H. A; MICHAELSEN, T. E. The malian medicinal plant *Trichilia emetica*; study on polysaccharides with complement fixing ability. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 279-287, 2003.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p. 325-339, 2001.
- DONATINI, R. S; ISHIKAWA, T; BARROS, S. B. M; BACCHI, E. M. Atividade antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, 1A, p. 89-94, 2009.
- EIRAS, C; PASSOS, I. N. G; BRITO, A. C. F; SANTOS JÚNIOR, J. R; ZUCULOTTO, V; OLIVEIRA Jr, O. N; KITAGAWA, I. L; CONSTANTINO, C. J. L; CUNHA, H. N. Nanocompósitos eletroativos de poli-*o*-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1158-1162, 2007.
- FARIA-TISCHER, P. C. S. **Estrutura química, propriedades reológicas e atividade antiviral das galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae***

(**Gigartinales**). Curitiba: 2006. Tese (Bioquímica e Biologia Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FÁVARO, S. L; GUILHERME, M. R; DE OLIVEIRA, F; RADOVANOVIC, E; MUNIZ, E. C. **Modificação química da goma arábica para obtenção de hidrogéis superabsorventes**. Disponível em < <http://www.metallum.com.br/17cbecimat/resumos/17Cbecimat-401-018.pdf> >. Acessado em: 09 de fevereiro de 2010.

FERREIRA, J; TRICHÊS, K. M; MEDEIROS, R; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the nociception produced by protein kinase c activation in mice. **Pain**, v. 117, p. 171 – 181, 2005.

FINCHER, C. B; STONE, B. A; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. **Annual Review Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

FINCHER, C. B; STONE, B. A; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de b-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. Santa Maria: 2006. 168 f. Tese (Agronomia) – Setor de Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria.

FLORES, R; MALDANER, J; NICOLOSO, F. T. I. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.

FLORIANO, E. P. **Produção de mudas florestais por via assexuada**. Santa Rosa: Caderno Didático n. 3, 2004.

FRANCISCHI, J. N. Antiinflamatórios, analgésicos e antitérmicos. In: FRANCISCHI, J. N; Col.: CASTRO, M. S. A; LOPES, M. T. P; TURCHETTI-MAIA, R. M. M. **A farmacologia em nossa vida**. Belo Horizonte: Editora UFMG. p. 57-77. 2005.

FUJIMIYA, Y; SUZUKI, Y, OSHIMAN, K, KOBORI, H, MORIGUCHI, K. Seletive tumoricidal effect of soluble proteoclucan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. Mediated via natural killer cell activation and apoptosis. **Cancer Immunol Immunother**, vol.: 46, 147-159p.,1998.

GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GABRIELLI, I; GATENHOLM, P; GLASSER, W. G; JAIN, R. K; KENNE, L. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 367-374, 2000.

GEORGE, E. F; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics Limited, 1984.

GLIMN-LACY, J; KAUFMAN, P. B. **Botany Illustrated - Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families**. 2 ed. Springer. p.85-86, 2006.

GONZÁLEZ, M. E; CARRASCO, L. Animal viruses promote the entry of polysaccharides with antiviral activity into cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 146, n. 3, p. 1303-1310, 1987.

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

GUERRA, M. P; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANNG, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR (Orgs.).

Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª. Ed., Porto Alegre-Florianópolis: Ed. Da Universidade-Editora da UFSC, 2001. p.13-40.

GUZMÁN, S; GATO, A; LAMELA, M; FREIRE-GARABAL, M; CALLEJA, J. M. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 6, p. 665-670, 2003.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNONA, M. R. Isolation and structural characterization of protopectin from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 205-213, 2005.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**. (in press), 2005.

HUGHES, J; RAMOS, G; MOYNA, P. Main components in *Cereus peruvianus* epicuticular wax. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 5, p. 564-566, 1980.

INGROUILLE, M; EDDIE, B. **Plants: evolution and diversity**. Cambridge University Press. p. 299-303, 2006.

JAIN, A; JAIN, S. K. *In vitro* and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 5, p. 404-416, 2008.

KAKURÁKOVÁ, M; CAPEK, P; WELLNER, N; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 195-203, 2000.

KANEKIYO, K; HAYASHI, K; TAKENAKA, H; LEE, J; HAYASHI, T. Anti-herpes Simplex Virus Target of an Acidic Polysaccharide, Nostoflan, from the Edible Blue-Green Alga *Nostoc flagelliforme*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. Vol.30, n.8, p. 1573-1575. 2007.

KARDOSOVÁ, A; EBRINGEROVÁ, A ; ALFOLDI, J; NOSAL'OVA, G; MATAKOVA, T.; HRIBALOVA, V. Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 165-176, 2004.

KARDOSOVÁ, A; MACHOVÁ, E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. **Fitoterapia**, v. 77, p. 367-373, 2006.

KENDE, H; ZEEVAART, J. A. A. The five classical plant hormones. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1197-1210, 1997.

KHAWAR, K. M; SANCAK, C; URANBEY, S; ÖZCAN, S. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. **Turk Journal Botany**, v. 28, p. 421-426, 2004.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206–220, 2005.

KRISHNAVENI, K.S.; RAO, J. V. S. A new triterpene from callus of *Pterocarpus santalinus*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 10-13, 2000.

KWEON, D. K; SONG, S. B; PARK, Y. Y. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. **Biomaterials**, v.24, p.1595–1601, 2003.

LAMB, D. H; LEI, Q. P; HAKIM, N; RIZZO, S; CASH, P. Determination of meningococcal polysaccharides by capillary zone electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 338, p. 263-269, 2005.

LEE, J.-H; PARK, Y.-H. Optimal production of curdlan by *Agrobacterium* sp. with feedback inferential control of optimal pH profile. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 525-530, 2001.

- LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601–606, 1969.
- LIMA, C. R; COSTA-SILVA, J. H; LYRA, M. M. A; ARAÚJO, A. V; ARRUDA, V. M; DIMECH, G. S; EVÊNCIO, L. B; FRAGA, M. C. C. A; LAFAYETTE, S. S. L; WANDERLEY, A. G. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 544-549, 2006.
- MACHADO, F. A. P. S. A; CAPELASSO, M; OLIVEIRA, A. J. B; GONÇALVES, R. A. C; ZAMUNER, M. L. M; MANGOLIN, C. A; MACHADO, M. F. P. S. Alkaloid production and isoenzymes expression from cell suspension culture of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Journal of Plant Science**, v. 1, n. 4, p. 324-331, 2006.
- MACHADO, F. A. P. S. A; OLIVEIRA, A. J. B; MANGOLIN, C. A; GOBBI-FILHO, L; MACHADO, M. F. P. S. Polysaccharide production from callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 313 – 316, 2004.
- MACHADO, M. F. P. S; COLLET, S. A. O; MANGOLIN, C. A. **Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais “in vitro”**. Maringá: EDUEM. p.30-39.,1999.
- MAGATON, A. S; PILÓ-VELOSO, D; COLODETTE, J. L. Caracterização das O-acetil-(4-O-metilglicurono)xilanas isoladas da madeira de *Eucalyptus urograndis*. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1085-1088, 2008.
- MANGOLIN, C. A.; PRIOLI, A. J.; MACHADO, M. F. P. S. Isozyme patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**. Vol. 32, p. 237-247. 1994(b).
- MANGOLIN, C. A; MACHADO, M. F. P. S. Isozyme extraction from shoot tissue of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) for electrophoretic analysis. **Biochemical Genetics**, v. 35, p. 205-210, 1997.
- MANGOLIN, C. A; PRIOLI, A. J; MACHADO, M. F. P. S. Alcohol dehydrogenase isozymes as marked at 2,4-D x kin combination in callus and regenerated plants of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**. Vol. 32, p. 191-200. 1994(a).
- MANTOVANI, M. S; MATUO, R; BELLINI, M. F; OLIVEIRA, R. J; RIBEIRO, L. R. Atividade clastogênica e genotóxica de altas concentrações do extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis* e diferentes respostas quando associado aos inibidores de reparo de DNA, ARA-C e 3DEOT, *in vitro*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, n. 1, p. 13-22, 2006.
- MARTINS, C. F; NICOLOSO, F. T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 53-61, 2004.
- MCCURDY, C.R.; SCULLY, S.S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Science**, v. 78, p. 476 – 484, 2005.
- MELLINGER, C. G. **Caracterização estrutural e atividade biológica de carboidratos de Phyllanthus niruri (Quebra-pedra)**. Curitiba: 2006. 156 f. Tese (Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MELLINGER, C. G; CARBONERO, E. R; NOLETO, G. R; CIPRIANI, T. R; OLIVEIRA, M. B. M; GORIN, P. A. J; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of na arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1479-1483, 2005.
- MENESTRINA, J. M; IACOMINI, M; JONES, C; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

- MIZRAHI, Y.; NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. In: J. Janick, Editor, **Perspectives on New Crops and New Uses**. American Society for Horticultural Sciences Press, Alexandria, p. 358–366, 1999.
- MOON, C.-J; LEE, J.-H. Use of curdlan and activated carbon composed adsorbents for heavy metal removal. **Process Biochemistry**, 2004.
- MOREIRA, M. E. C; SANTOS, M. H; PEREIRA, I. O; FERRAZ, V; BARBOSA, L. C. A; SCHNEEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de carboidratos produzidos por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, 31, n. 7, p. 1738-1742, 2008.
- MURUA, A; PORTERO, A; ORIVE, G; HERNANDEZ, R. M; DE CASTRO, M; PEDRAZ, J. L. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 2, p. 76-83, 2008.
- NERD, A; TEL-ZUR, N; MIZRAHI, Y. Fruits of vine and columnar cacti. In: NOBEL, P. S. **Cacti – Biology and Uses**. University of California Press: Londres. p. 185-197, 2002.
- NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; ATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.
- NICOLOSO, F. T; ERGI, A. C; MARTINS, C. F; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Petersen), **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.
- NIERO, R; MALHEIROS, A; BITTENCOURT, C. M.S; BIAVATTI, M. W; LEITE, S. N; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: CECHINEL FILHO, V; BRESOLIN, T. M. B. **Ciências químico-farmacêuticas: contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003. p. 11-56.
- NINIO, R; LEWINSOHN, E; MIZRAHI, Y; SITRIT, Y. Quality attributes of stored koubo (*Cereus peruvianus* (L.) Miller) fruit. **Postharvest Biology and technology**, v. 30, p. 273-280, 2003.
- NISHI, H; KUWAHARA, Y. Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing noncyclic mono-, oligo- and polysaccharides as chiral selectors. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 48, n. 2, p. 89-102, 2001.
- NISHINARI, K; TAKAHASHI, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, p. 396-400, 2003.
- NISHINARI, K; ZHANG, H; IKEDA, S. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 195-201, 2000.
- NOZAKI, J., MESSERSCHMIDT, I., RODRIGUES, D. G. Tannery waters cleaning with natural polyelectrolytes: Chemical speciation studies of chromium. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, p. 761-770, 1993.
- NYFFELER, R. Phylogenetic relationships in the Cactus Family (Cactaceae) based on evidence from *TRNK1*, *MATK* and *TRNL-TRNF* sequences. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 2, p. 312–326, 2002.
- O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: DEY, D. M. **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1990, p. 415-441.
- OKSMAN-CALDENTEY, K; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.

- OLIVEIRA, A. J. B.; MACHADO, M. F. P. S. Alkaloid production by tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 149–155, 2003.
- OLIVEIRA, M. A; RODRIGUES, C; REIS, E. M; NOZAKI, J. Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and *Opuntia ficus indica*. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 307-310, 2001.
- OLIVEIRA, M. R. T; LIMA, E. D. P. A; LIMA, C. A. A; SILVA, A. Q; REGO, F. A. O. Caracterização física e físico-química dos frutos de palma (*Opuntia monacantha*, How) e mandacaru (*Cereus peruvianus*, Mill). **Agropecuária Técnica**. Vol. 13, n. 1/2, p. 49-53. 1992.
- OLIVEIRA, S. A; MACHADO, M. F. P. S; PRIOLI, A. J; MANGOLIN, C. A. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **In Vitro Cellular & Development Biology Plant**, v. 31, p. 47-50, 1995.
- OVODOVA, R. G; GOLOVCHENKO, V. V; POPOV, S. V; POPOVA, G. Y; PADERIN, N. M; SHASHKOV, A. S; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. **Food Chemistry**, v. 114, p. 610-615, 2009.
- PENG, Y; ZHANG, L; ZENG, F; KENNEDY, J. F. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 3, p. 385-392, 2005.
- PEREIRA, B. M. R; DA SILVA, B. P; PEREIRA, N. A; PARENTE, J. P. Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 409-413, 2000.
- PINTO, A. C; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V. S; LOPES, N. P; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.
- POPOV, S. V; POPOVA, G. YU; OVODOVA, R. G; OVODOV, YU. S. Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. **Fitoterapia**, v. 76, v.3-4, p. 281-287, 2005.
- PULS, J; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: **Hemicellulose and hemicellulases.**, London: Portland Press Research Monograph, 1993, p. 1-27.
- QUEMENER, B; MAROT, C; MOUILLET, L; DA RIZ, V; DIRIS, J. Quantitative analysis of hydrocolloids in food systems by methanolysis coupled to reverse HPLC. Part 1. Gelling carrageenans. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 1, p. 9-17, 2010.
- RAMAKRISHNAN, A; PANDIT, N; BADGUJAR, M; BHASKAR, C; RAO, M. Encapsulation of endoglucanase using a biopolymer Gum Arabic for its controlled release. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 368-372, 2007.
- RAO, S; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.
- REDGWELL, R. J; SCHMITT, C; BEAULIEU, M; CURTI, D. Hydrocolloids from coffee: physicochemical and functional properties of an arabinogalactan–protein fraction from green beans. **Food hydrocolloids**, v. 19, n. 6, p. 1005-1015, 2005.
- REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 205-236, 1997.
- RENAUD, M; BELGACEM, M. N; RINAUDO, M. Rheological behavior of polysaccharide aqueous solutions. **Polymer**, v. 46, p. 12348-12358, 2005.

- RESENDE, A. G. **Polimorfismo de DNA em plantas regeneradas *in vitro* nos descendentes RF1 de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. Maringá: 2006. Tese (Biologia Celular) – Departamento de Biologia, Universidade estadual de Maringá.
- REZANKA, T.; DEMBITSKY, V. M. Very-long-chain alkyl esters in *Cereus peruvianus* wax. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1145–1148, 1998.
- REZENDE, R. A.; BARTOLO, P. J.; MENDES, A.; MACIEL FILHO, R. **Análise do comportamento mecânico do alginato como biomaterial para a fabricação de Scaffolds na engenharia de tecidos**. Disponível em < http://www2.rc.unesp.br/eventos/educacao_fisica/biomecanica2007/upload/261-1-B-Artigo_CBB2007.pdf >. Acessado em: 09 de fevereiro de 2010.
- RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 433-440, 2001.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433–443, 1979.
- ROCHA, E. A.; AGRA, M. F. Flora do pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae juss. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n. 1, p. 15-21, 2002.
- ROCHFORD, T. C. Cacti & Succulents. In: DAVIDSON, W.; ROCHFORD, T. C. **House Plants – Cacti & Succulents**. Hamlyn: Inglaterra. p. 92-111, 1976.
- ROMANHOLI, L. K. S. **Estudo das propriedades dos complexos de ácido hialurônico com os íons metálicos Cu⁺², Zn⁺² e Gd⁺³**. Curitiba: 2005. Dissertação (Engenharia e Ciência dos Materiais) – Setor de Engenharias, Universidade Federal do Paraná.
- ROVIO, S.; SIMOLIN, H.; KOLJONEN, K.; SIRÉN, H. Determination of monosaccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 1185, n. 1, p. 139-144, 2008.
- ROWLEY, A. F.; VOGAN, C. L.; TAYLOR, G. W.; CLARE, A. S. Prostaglandins in noninsectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 3-14, 2005.
- SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**. 57(2-3):119-31, 1999.
- SANMUGAPRIYA E.; VENKATARAMAN S. Antiulcerogenic potential of Strychnos potatorum Linn seeds on Aspirin plus pyloric ligation-induced ulcers in experimental rats. **Phytomedicine**, v. 14, p. 360-365, 2007.
- SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.
- SAYED, S. S.; ABOU-DAHAB, T. A.; YOUSSEF E. M. A. *In vitro* propagation of cactus (*Cereus peruvianus* L.). **Arab Journal Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 169-176, 2005.
- SCHOLZEN, T. E.; STANDER, S.; RIEMANN, H.; BRZOSKA, T.; LUGER, T. A. Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin-converting enzyme. **Journal of Immunology**, 170: 3866-3873, 2003.
- SENDL, A.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Sedum telephium*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1357-1362, 1993.
- SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.1467–1480, 2004.

- SILVA, I. T. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth. Urticaceae (embaúba)**. Florianópolis: 2009. 133f. Dissertação (Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Santa Catarina.
- SILVA, W. R. **Polinização e Dispersão de *Cereus peruvianus* Miller (Cactaceae) na Serra do Japi, Estado de São Paulo**. Campinas: 1983. Dissertação (Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- SKEHAN, P; STORENG, R; SCUDIERO, D; MONKS, A; MCMAHON, J; VISTICA, D; WARREN, J. T; BOKESCH, H; KENNEY, S; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.
- SOUTO-MAIOR, J. P. A; REIS, A. V; PEDREIRO, L. N; CAVALCANTI, O. A. Avaliação da pectina fosfatada aplicada na formação de filmes isolados. Material candidato a novos sistemas para liberação modificada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 2, p. 203-213, 2008.
- STANLEY, P. L; STEINER, S; HAVENS, M; TRAMPOSCH, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate. **Journal of Pharmacological and Biophysical Research**, v. 4, n. 4, 1991.
- SUTOVSKÁ, M; FRANOVÁ, S; PRISEZNAKOVÁ, L; NOSÁL'OVÁ, G; TOGOLA, A; DIALLO, D; PAULSEN, B. S; CAPEK, P. Antitussive activity of polysaccharides isolated from the Malian medicinal plants. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 236-239, 2009.
- TALARICO, L. B; ZIBETTI, R. G. M; FARIA, P. C. S; SCOLARO, L. A; DUARTE, M. E. R; NOSEDA, M. D; PUJOL, C. A; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**. Vol. 34, p. 63-71, 2004.
- TANIGUCHI, S; IMAYOSHI, Y; KOBAYASHI, E; TAKAMATSU, Y; ITO, H; HATANA, T; SAKAGAMI, H; TOKUDA, H; NISHINO, H; SUGITA, D; SHIMURA, S; YOSHIDA, T. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 315-323, 2002.
- TAYLOR, I. K; SHAW, R. J. The mechanism of action of corticosteroids in asthma. **Respiratory Medicine**, v. 87, p. 261-277, 1993.
- TIWARI, V; TIWARI, K. N; SINGH, B. D. Comparative studies of cytokinin on *in vitro* propagation of *Bacopa monniera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 9-16, 2001.
- TOKER, G; MEMISOGLU, M; TOKER, M. C; YESILADA, E. Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 74, p. 618-623, 2003.
- TOMÁS, J; CAMPS, F; CLAVERIA, E; COLL, J; MELE, E; MESSEGUER, J. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* *in vivo* and *in vitro* cultures **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1585-1591, 1992.
- VAINIO, H; MORGAN, G. Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 81, p. 151-2, 1997.
- van RYN, J; PAIRET, M. Clinical experience with cyclooxygenase-2 inhibitors. **Inflammation Research**, v. 48, p. 247-254, 1999.
- VANE, J. R; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thrombosis Research**., v. 110, p. 255-258, 2003.
- VANE, J. R; BOTTING, R. M. The mode of action of anti-inflammatory drugs. **Postgraduate Medical Journal**, v. 66, suppl.4, p. S2-17, 1990.

- VENKATAIAH, P; CHRISTOPHER, T; SUBHASH, K. Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 245-250, 2003
- VERPOORTE, R; MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: YUNES, R.A; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 381-432.
- VIANA FILHO, R. P. **Aplicação de polissacarídeos em emulsão cosmética: análises reológicas**. Curitiba: 2009. Dissertação (Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- WHISTLER, R. L. **The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry**. London: Academic Press., p. 447-458, 1970.
- WITVROUW, M.; ESTE, J.A.; MATEU, M.Q.; REYMEN, D.; ANDREI, G.; SNOECK, R.; IKEDA, S.; PAUWELS, R.; BIANCHINI, N.V.; DESMYTER, J., DE CLERCQ, E. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 5, p. 297–303, 1994.
- YANG, L. C; MARSALA, M; YAKSH, T. L. Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE₂ release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. **Pain**. V. 67, n. 2-3, p. 345-354, 1996.
- YE, Y. N., SO, H. L., LIU, E. S. L., SHIN, V. Y., CHO, C. H. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. **Life Sciences**, v. 72, p. 925-932, 2003.
- ZARONI, M. **Polissacarídeos no desenvolvimento de péletes de teofilina de liberação colônica**. Curitiba: 2006. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.
- ZHU, W; CHIU, L. C. M; OOI, V. E. C; CHAN, P. K. S; ANG JR, P. O. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against *Herpes simplex* virus type 1. **Phytomedicine**. Vol. 1, p. 01-06. 2005.