



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIULCEROGÊNICA GÁSTRICA DOS POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DA CULTURA DE CALOS DE *Cereus peruvianus* Mill.
(CACTACEAE)

MILENA DE OLIVEIRA JAYME

MARINGÁ

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIULCEROGÊNICA GÁSTRICA DOS POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DA CULTURA DE CALOS DE *Cereus peruvianus* Mill.
(CACTACEAE)

MILENA DE OLIVEIRA JAYME

Orientador: Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Regina Aparecida Correia Gonçalves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

MARINGÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

J42c Jayme, Milena de Oliveira
 Caracterização química e atividade
 antiulcerogênica gástrica dos polissacarídeos
 obtidos da cultura de calos de *Cereus peruvianus*
 Mill. (CACTACEAE) / Milena de Oliveira Jayme. --
 Maringá, 2013.
 71 f. : il. col., figs., tabs. + Apêndices,
 Anexos

Orientador: Prof. Dr. Arildo José Brás de
 Oliveira.
 Coorientadora: Prof.a Dr.a Regina Aparecida
 Correia Gonçalves.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento
 de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Farmacêuticas, 2013.

1. *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) -
 Polissacarídeos. 2. Plantas - Cultura de calos. 3.
 Plantas - Cultura *in vitro* de células e tecidos. 4.
Cereus peruvianus Mill (Cactaceae). 5. *Cereus*
peruvianus (mandacaru) - Polissacarídeos - Extração.
 6. *Cereus peruvianus* (mandacaru) - Metabólitos
 primários. 7. Atividade antiúlcera. I. Oliveira,
 Arildo José Brás de, orient. II. coorien. Gonçalves,
 Regina Aparecida Correia. III. Universidade Estadual
 de Maringá. Centro de Ciências da Saúde.
 Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação
 em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 21.ed. 615.3

MN-0001102

MILENA DE OLIVEIRA JAYME

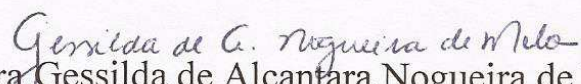
**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA
GÁSTRICA DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA CULTURA DE CALOS
DE *CEREUS PERUVIANUS* MILL (CACTACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 01 de novembro de 2013

BANCA EXAMINADORA


Dr. Arildo José Braz de Oliveira


Dra Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo


Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

**Dedico este trabalho aos meus pais, Luís e Maria Helena, pelo esforço e dedicação
em proporcionar meu maior legado: o estudo.**

Agradecimentos

Aos meus pais, por me proporcionarem a oportunidade de me dedicar aos estudos e por estarem sempre torcendo por mim, me apoiando em minhas escolhas.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveirae Prof^a. Dra. Regina Aparecida Correia Gonçalves, pela orientação, oportunidade e ensinamentos.

À Prof^a.Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado, do Departamento de Biotecnologia, Genética eBiologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, por ceder uma grande quantidade de cultura de calos de *Cereus peruvianus* cultivada há anos em seu laboratório.

À Prof^a. Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado, pela supervisão e orientação nos testes de atividade antiúlcera e por ter gentilmente permitido a realização dos experimentos em seu Laboratório de Inflamação, no Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Universidade Estadual de Maringá.

À aluna de iniciação científica Franciele Ames e ao técnico Jailson do Laboratório de Inflamação, por aceitar fazer os testes de atividade antiúlcera em conjunto, pela dedicação, esforço e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, por permitir o uso do liofilizador em seu Laboratório PALAFITO, no Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá e às suas alunas de mestrado Maísa Leite e Vanessa Munhoz, por sempre agendarem rapidamente o equipamento para meu uso e, em especial, pela amizade conquistada.

Ao Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki, por me receber em seu laboratório no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR (UFPR), onde grande parte dos experimentos foi realizada.

À Fhernanda Smiderle e à Fernanda Simas, pós-doutorandasno Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, por me acolherem tão bem, pelo carinho,ensinamentos, orientação e pela disponibilidade em me auxiliarno período que estive em Curitiba e, mesmo a distância, continuam me ajudando quando preciso.

Ao Larry Ramos, pós-doutorando no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, pelo carinho e disponibilidade em me auxiliar e em realizar as análises no HPSEC-MALLS.

À Prof^a. Dra. Lucimara M. C. Cordeiro do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná e sua aluna de mestrado Thaisa Moro, por me ajudar com as análises de HPSEC-MALLS.

À Rosane, funcionária do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, por me atender tão prontamente para realizar as análises no CG-MS.

Aos amigos Vanderson Fenelon, Juliana Cerquetani, Isabela de Lima, Marina Casaril e Thiago Almeida pela amizade. Desejo tudo de bom para vocês e, mesmo que nossos caminhos tomem rumos diferentes, espero que nossa amizade continue a ser cultivada!

Aos meus queridos amigos Matheus Rodrigues e Uéliton Sinhoreto por estarem sempre presentes em minha vida nos últimos anos, pela amizade, conselhos, risadas, estímulos e por tudo o que compartilhamos. Desejo o melhor para vocês!

Às companheiras de laboratório: Sheila Sanches Lopes, aluna de doutorado, Débora Jacomini e Edilainy Rizzieri, alunas de mestrado e Graciele Balestro pela amizade, apoio, conselhos e momentos de descontração. Desejo tudo de bom para vocês!

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à funcionária Helena.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos que me ajudaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Obrigada!

**"Os dias prósperos não vêm ao acaso: são granjeados como as searas, com
muita fadiga e com muitos intervalos de desalento".**

Camilo Castelo Branco

RESUMO

O cacto “Mandacaru”, *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae), possui muitas aplicações com fins econômicos e industriais. A cultura de calos e de células em suspensão de *C. peruvianus* é uma via alternativa para a síntese em escala industrial de produtos originalmente produzidos pelas plantas. O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar estruturalmente os polissacarídeos da cultura de calos de *C. peruvianus* bem como avaliar a sua atividade farmacológica antiulcerogênica. O polissacarídeo obtido por extração aquosa à quente da cultura de calos foi dialisado e submetido ao processo de gelo-degelo, fornecendo o polissacarídeo PAG constituído de galactose, arabinose, ácido urônico, xilose 71:15:9:5, além de traços de ramnose. Este perfil de composição monossacarídica sugere que o polissacarídeo encontrado poderia ser uma arabinogalactana, tal como a encontrada originalmente na planta. PAG apresentou-se heterogêneo quando analisado por HPSEC-MALLS. O polissacarídeo PAG apresentou atividade antiulcerogênica significativa no modelo induzido por etanol com valores de DE_{50} de 74 mg kg⁻¹. O efeito gastroprotetor deste polissacarídeo pode estar relacionado à habilidade destes polímeros em aderir à superfície da mucosa gástrica, atuando como uma eficaz barreira inibidora da erosão da mucosa.

Palavras Chave: *Cereus peruvianus*, Mandacará, cultura de calos, caracterização química, atividade antiúlcera.

ABSTRACT

The cactus "Mandacaru", *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) has many applications with economic and industrial interest. The culture of callus of *C. peruvianus* is an alternative source for the synthesis of products originally produced by plants. We now report isolation procedure, characterization and structural analysis of polysaccharides from callus culture of *C. peruvianus* and determination of its antiulcerogenic effect. The polysaccharide obtained was dialyzed and subjected to freeze-thaw process, providing PAG polysaccharide consisting of galactose, arabinose, uronic acid and xylose in the ratio of 71:15:9:5, besides traces of rhamnose. This profile of monosaccharide composition suggests that the polysaccharide may be an arabinogalactan, such as that found in the plant originally. This appeared heterogeneous when analyzed by HPSEC-MALLS. The polysaccharide PAG showed significant antiulcerogenic activity in ethanol-induced model suggesting that the gastroprotective effect of this arabinogalactan is due to the ability of these polymers adhere to the surface of the gastric mucosa, acting as an effective barrier inhibiting mucosal erosions.

Keywords: *Cereus peruvianus*, Mandacará, callus culture, chemical characterization, antiulcer activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cacto <i>Cereus peruvianus</i> : caule, fruto e flor.	18
Figura 2. Cadeia linear de ácido D-galacturônico, típica de pectinas.	28
Figura 3. Estrutura das arabinogalactanas tipo I (A) e arabinogalactanas tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993).	31
Figura 4. Cultura de calos de <i>Cereus peruvianus</i>	37
Figura 5. Fluxograma do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos pela extração aquosa à quente da cultura de calos de <i>C. peruvianus</i>	39
Figura 6. Polissacarídeo PAG liofilizado.	47
Figura 7. Perfil de eluição em HPSEC-MALLS do polissacarídeo PAG.	49
Figura 8. Efeito protetor de PAG (30, 100 e 200 mg.kg ⁻¹ , diluído em água, v.o.), sobre as lesões gástricas induzidas por EtOH (C: controle, água 0,1 ml/100 g, v.o. e Cim: cimetidina 100 mg/kg, diluída em salina 0,9%, v.o.). Os resultados são expressos como média ± erro médio padrão (n = 6). ^a p < 0,001 quando comparado ao grupo controle.	50
Figura 9. Efeito do PAG (30, 100 e 200 mg kg ⁻¹ , diluído em água, v.o.), sobre as lesões gástricas induzidas por injeção subcutânea de indometacina (C: controle, água 0,1 ml/100 g, v.o. e Cim: cimetidina 100 mg kg ⁻¹ , diluída em salina 0,9%, v.o.). Os resultados foram expressos como média ± erro médio padrão (n = 6). ^a p < 0,001 quando comparado ao grupo controle.	534

LISTA TABELAS

Tabela 1. Efeito do polissacarídeo PAG extraído da cultura de calos de *C. peruvianus* nas úlceras induzidas por etanol em ratos. 51

Tabela 2. Efeito do polissacarídeo PAG extraído da cultura de calos de *C. peruvianus* nas úlceras induzidas por injeção subcutânea de indometacina em ratos..... 54

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

Ara	Arabinose
EtOH	Etanol
Gal	Galactose
GalA	Ácido galacturônico
Glc	Glucose
GlcA	Ácido Glicurônico
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
HPSEC-MALLS	Cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz
Man	Manose
Me ₂ SO	Dimetilsulfóxido
m/v	relação entre massa e volume
<i>m/z</i>	relação massa / carga
PAG	Polissacarídeo extraído em água
p/v	Peso/volume
Rha	Ramnose

r.p.m.	Rotações por minuto
TFA	Ácido trifluoracético
v/v	Volume/volume
v.o	Via oral
Xil	Xilose

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aplicação das cactáceas	19
1.2. Cultura de calos	21
1.3. Polissacarídeos de vegetais	24
1.3.1. Polissacarídeos e atividade antiúlcera	32
2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	35
3. OBJETIVO GERAL	35
3.1. Objetivos Específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Cultura de calos	37
4.2. Obtenção dos polissacarídeos	38
4.2.1. Deslipidificação e despigmentação	38
4.2.2. Extração aquosa	38
4.3. Purificação do polissacarídeo	38
4.3.1. Separação dos polissacarídeos por congelamento e descongelamento	38
4.4. Composição Monossacarídica do polissacarídeo isolado	40
4.4.1. Hidrólise ácida total	40
4.4.2. Redução e acetilação dos produtos de hidrólise	40
4.5. Teste de Homogeneidade	41

4.5.1. Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS).....	41
4.6. Análises Químicas	41
4.6.1. Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	41
4.6.2. Cromatografia em fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)	42
4.7. Determinações espectrofotométricas	42
4.7.1. Dosagem de açúcar total.....	43
4.7.2. Dosagem de proteínas totais	43
4.7.3. Dosagem de ácidos urônicos	44
4.8. Atividade antiúlcero-gênica gástrica.....	44
4.8.1. Avaliação das lesões.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Extração e purificação.....	47
5.2. Caracterização química do PAG.....	48
5.2. Avaliação da atividade antiulcerogênica de PAG.....	49
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	56
7. REFERÊNCIAS	58
8. APÊNDICES	71
9. ANEXOS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A família Cactaceae apresenta aproximadamente 125 gêneros e 1.900 espécies, sendo distribuídas principalmente nas regiões semiáridas das Américas (ARACE, 2004). No Brasil, estão registradas 160 espécies dentre as quais 80 ocorrem na região Nordeste (ARRUDA; PINNA; ALVES, 2005).

As cactáceas são dicotiledôneas suculentas de diversos hábitos, podendo ser árvores, arbustos, trepadeiras, epífitas ou geófitas. Suas hastes (talos) podem ser colunares, roliços, globulares, tuberculados, em forma de costeletas, asas ou achatados, geralmente segmentados sem folhas e com espinhos (BARTHLOTT; HUNT, 1993).

O Gênero *Cereus* pertence à subfamília *Cactoideae*, caracterizada pela ausência de folhas e presença de hastes suculentas com aréolas bem desenvolvidas (BARTHLOTT; HUNT, 1993). *Cereus* é um dos mais antigos entre os nomes de cactos, tendo sido descritos por Philip Miller desde 1754. O nome do gênero tem origem no latim, de cera, ou cone de cera ou tocha, e se refere à forma de candelabro hexagonal (ANDERSON, 2001). Este gênero pertence ao grupo *Cereoideae*, que compreende plantas tipo árvore ou arbustos de hastes (talos), com inúmeras ramificações ou troncos (BARTHLOTT; HUNT, 1993). A morfologia dos caules nas cactáceas é considerada uma característica marcante para discriminar gêneros e espécies de cactos. (ALTESOR; EZCURRA, 2003). O gênero *Cereus* é caracterizado pelo caule ereto, tipo colunar ascendente com um número e disposição de costelas longitudinais variáveis, onde estão inseridos os botões axilares contendo espinhos (folhas modificadas) conhecidos como aréolas (BRITTON; ROSE, 1963; ANDERSON, 2001).

Cereus peruvianus é uma espécie de cacto popularmente conhecida no Brasil como mandacará (RESENDE, 2006). É comumente encontrada nos jardins em países tropicais e

subtropicais e vem sendo cultivada comercialmente em pequena escala em Israel, sendo conhecida como *fruit crop*. O nome comercial dada pela companhia israelense de exportação é “Koubo”(NERD; TEL-ZUR; MIZRAHI, 2002).

Este cacto possui porte arbóreo, atingindo em torno de 4 a 5 m de altura, entretanto plantas com até 7 m possam ser encontradas (Figura 1). O caule é colunar, com ramificações candelabriiformes. Ao longo do seu comprimento, os ramos são divididos por constrições, que formam segmentos distintos chamados artículos, cujos comprimentos variam de 50 a 60 cm. Os 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 à presença de cera na cutícula (SILVA, 1983).

Figura 1. Cacto *Cereus peruvianus*: caule, fruto e flor.



FONTE:(TANAKA, 2010)

1.1. Aplicação das cactáceas

As cactáceas são conhecidas principalmente pelo valor ornamental, mas também têm sido de grande importância forrageira, servindo de alimentação a bovinos, caprinos e ovinos (ROCHA; AGRA, 2002). No Brasil, o fruto da palma conhecido como figo-da-índia é comercializado em algumas regiões "in natura" e na forma de geléias, marmeladas e passas. O fruto de *C. peruvianus*, apesar de seu baixo teor de proteína e vitaminas, é utilizado no país como alimento humano e para o gado em períodos de seca (OLIVEIRA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Shedbalkar e colaboradores (2010) descrevem diversas aplicações das cactáceas em geral, desde benefícios à saúde pela presença de carotenóides, antioxidantes e ácido ascórbico no fruto, bem como pela ação antiúlcera, hipoglicemiante, hipolipemiantes e anti-inflamatória de algumas espécies de cacto. Os frutos de cactáceas podem ser utilizados na indústria de alimentos como espessantes (SAWAYA *et al.*, 1983) e como novos adoçantes naturais (SAENZ *et al.*, 1998; SAENZ; SEPÚLVEDA, 2001).

O gênero de cactáceas *Opuntia spp*, conhecida popularmente como palma, é produtor de mucilagem. Em alguns países, os pequenos agricultores usam mucilagem do cacto para purificar a água potável. Recentemente, um extrato de extrato cladódios do cacto foi testado para melhorar a infiltração de água no solo (SAENZ; SEPULVEDA; MATSUHIRO, 2004).

A fitorremediação é uma tecnologia eficaz para a limpeza dos poluentes ambientais perigosos. Cactos são tão resistentes que podem ser plantas ideais para diminuir a carga de poluentes tóxicos no ambiente, absorvendo e armazenando metais pesados tóxicos e outros poluentes orgânicos em seus sistemas celulares. As cactáceas também são sequestrantes eficientes de poluentes, uma vez que tem raízes muito superficiais e maciças que podem

espalhar-se amplamente perto da superfície do solo, sendo capazes de limpar efetivamente uma grande parte de qualquer solo contaminado(GOLAN-GOLDHIRSH et al., 2004).

C. peruvianus apresenta interesse econômico e industrial por produzirem alcalóides aminados com propriedades farmacológicas importantes, tais como efeito similar à insulina e potencial inibidor de captação de noradrenalina(OLIVEIRA; MACHADO, 2003), ésteres de cera com potencial de aplicação como barreira impermeável (DEMBITSKY; REZANKA, 1996; REZANKA; DEMBITSKY, 1998) e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais, tais como: adjuvante na floculação de impurezas da água e em formulações cosméticas(ALVAREZ et al., 1992; NOZAKI; MESSERSCHMIDT; RODRIGUES, 1993; ALVAREZ et al., 1995), tratamento de efluentes(BARROS; NOZAKI, 2002), produção de polieletrólitos(OLIVEIRA et al., 2001), clarificação de extratos(FERNANDES et al., 2001).

Polieletrólitos são classes especiais de polímeros que contêm determinados grupos funcionais ao longo do polímero que podem ser ionizáveis(BRATBY, 1980). O cacto *C. peruvianus* atua como uma resina de troca iônica fortemente ácida. O processo de troca iônica envolve contato de uma fase fluida móvel (líquida ou gasosa) com uma fase imóvel (sólida) (FERNANDES et al., 2001). A floculação e a coagulação consistem na clarificação das águas pelo arraste do material finamente dividido em suspensão por agentes coagulantes (OLIVEIRA; REIS; NOZAKI, 2001a). Apesar da possibilidade de floculação e coagulação somente com os sais de alumínio ou ferro, existem casos em que é necessário o uso de auxiliares de floculação e coagulação. Como auxiliares, os mais usados são os polieletrólitos naturais ou sintéticos (OLIVEIRA; REIS; NOZAKI, 2001b).

Alguns trabalhos de análise bioquímica demonstraram a presença de determinadas enzimas (álcool desidrogenases, malato desidrogenases, esterases, isoperoxidase, isocitrato desidrogenase e fosfatase ácida) em cultura de tecidos de *C. peruvianus*, abrindo a

possibilidade da utilização dessas culturas como um catalisador biológico).(MACHADO *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2010).

Na medicina tradicional as cactáceas são amplamente utilizadas por curandeiros e tribos indígenas no México, como: analgésicos, antibióticos, diuréticos para o tratamento de problemas intestinais, tosse, afecções cardíacas e nervosas, alguns tipos de úlceras e para controle de diabetes e colesterol(HOLLIS; SCHEINVAR, 1995).

O uso de extratos de *Cereus peruvianus* é descrito associado a outras plantas pela ação cicatrizante e de baixa toxicidade(LIMA *et al.*, 2006) bem como ação anti-inflamatória, analgésica e antiulcerogênica(ARRUDA, 2008), sendo comercializado pelo nome Sanativo[®]. É possível encontrar também o extrato de *Cereus sp*, comercializado como KOUBO[®], e estudos confirmam sua eficácia na redução de peso(BERNARDI *et al.*, 2011).

Claramente, as cactáceas possuem atividades significativas com potenciais farmacológicos e de extratos promissores, por isso, o isolamento de compostos bioativos é outra área de interesse. Em função disso, técnicas de cultura de tecidos para a produção de plantas desta espécie estão sendo desenvolvidas, e o presente trabalho visa à utilização da cultura de tecidos de calos de *Cereus peruvianus* para produção de polissacarídeos de interesse.

1.2. Cultura de calos

A tecnologia do cultivo *in vitro* além de ser aplicada a plantas medicinais para propagação clonal *in vitro*, pode ser utilizada para produção de culturas de calos e de células em suspensão, visando à produção de compostos de interesse farmacêutico, cosmético e alimentar(ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000; GOMEZ-GALERA *et al.*, 2007). A

exploração da capacidade biossintética de várias culturas celulares tem ocorrido nas últimas décadas e novos conhecimentos têm sido relatados para uma grande variedade de produtos naturais(IAREMA, 2008).

Desta maneira, o cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa promissora para o suprimento de material vegetal. As técnicas de propagação *in vitro* representam ferramentas com alto potencial para aplicação no melhoramento vegetal. Elas podem ser utilizadas desde a multiplicação de material genético, para troca e avaliação de germoplasma, até a produção de mudas livres de vírus. Sua aplicação também se estende ao aumento da variabilidade genética mediante a produção de variantes somaclonais e como fase essencial para a obtenção de plantas transgênicas(ANDRADE, 2002).

Além disso, a cultura de células e tecidos vegetais é um sistema adequado para estudo de eventos fisiológicos, bem como das rotas biossintéticas, permitindo a otimização da produção *in vitro* de metabólitos primários e secundários, assim como a produção comercial de mudas clonais de espécies de interesse (IAREMA, 2008).

A cultura de calos e de células em suspensão de *Cereus peruvianus* é uma via alternativa para a síntese em escala industrial de produtos originalmente produzidos pelas plantas, tais como: alcalóides, polissacarídeos e ácidos graxos insaturados, com aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, de tintas, detergentes e de plástico. A transferência de células de calos friáveis para um meio líquido forma a cultura de células em suspensão que além de apresentar um crescimento mais rápido, podem liberar os metabólitos biossintetizados para o meio de cultivo e estes podem ser extraídos diretamente do meio. Neste sistema os precursores de metabólitos específicos podem ser adicionados ao meio de cultura para estimular as células a aumentar a produção do componente de interesse. (MACHADO *et al.*, 2004).

Para qualquer trabalho em cultura de tecidos de plantas a seleção e o desenvolvimento do meio de cultura é um ponto fundamental. A água, sais inorgânicos, vitaminas, fonte de carbono e os fitoreguladores são componentes essenciais de meio de cultivo. Há 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 (NICOLOSO *et al.*, 2001; MARTINS; NICOLOSO, 2004; FLORES; MALDANER; NICOLOSO, 2006)

O cultivo *in vitro* de plantas é influenciado pelo meio nutritivo, tipos, condições fisiológicas dos explantes, genótipos, condições de cultivo e pelos fitoreguladores. Devido às diferentes respostas dos tecidos frente às combinações hormonais e condições de cultivo *in vitro* a escolha do explante é de fundamental importância para indução de calogênese e morfogênese. Para determinar a melhor fonte de explante e combinações hormonais são necessários diversos ensaios iniciais no sentido de desenvolver protocolos de regeneração e/ou estabelecimento de calos (VENKATAIAH; CHRISTOPHER; SUBHASH, 2003; KHAWAR *et al.*, 2004).

O calo é um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante. Os calos diferem 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; TANAKA, 2010).

Atualmente, o cultivo de calos é considerado 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 (KRISHNAVENI; RAO, 2000; TANIGUCHI *et al.*, 2002; TOKER *et al.*, 2003; ARIKAT, 2004; MACHADO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2006).

A tecnologia de cultura de células possui diversas vantagens em relação ao método convencional. Este método de cultivo independe de variações geográficas, sazonais e ambientais, sendo que a disposição de um sistema de produção pré-estabelecido garante o fornecimento contínuo de produtos com rendimento e qualidades uniformes. Além disso, é possível a produção de compostos novos que normalmente não são encontradas na planta-mãe(OKSMAN-CALDENTY; INZE, 2004).

Portanto, a micropopagação de células *in vitro* pode ser um sistema de produção alternativo para obtenção de compostos de alto valor em plantas de difícil cultivo. A síntese química de compostos derivados de plantas nem sempre é economicamente viável em vista de sua estrutura altamente complexa e requisitos estereoquímicos específicos (RAO; RAVISHANKAR, 2002).

1.3. Polissacarídeos de vegetais

Polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo-se em um dos grupos de compostos mais abundantes e importantes da biosfera. Além disso, são os principais constituintes químicos das plantas visto que forma a parede celular, o suporte estrutural das células vegetais(REID, 1997).

Quimicamente, os polissacarídeos são poliacetais que contêm átomos de oxigênio ao longo da cadeia polimérica, sendo 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. As unidades monoméricas dos polissacarídeos, os sacarídeos, são frequentemente denominadas de açúcares ou carboidratos devido a sua fórmula molecular $C_x(H_2O)_y$ que representa um hidrato de carbono. Desta maneira, estes biopolímeros são considerados carboidratos complexos, que geralmente contém

multas moléculas de monossacarídeos interligadas por ligações glicosídicas (FOX; WHITESELL, 1994).

A grande diversidade de características estruturais dos polissacarídeos tem origem nas diferenças de composição monossacarídica, nos tipos e padrões de ligação, formas de cadeia e grau de polimerização, determinando as suas propriedades físicas, incluindo a solubilidade, o comportamento de fluxo, o potencial de gelificação, e / ou de propriedades de superfície e interfacial. A diversidade estrutural também determina as propriedades funcionais específicas apresentados pelos polissacarídeos (IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005).

Os polissacarídeos são amplamente utilizados na tecnologia de alimentos, principalmente pelas propriedades reológicas de suas soluções; sendo compostos de alto peso molecular, formam soluções coloidais em que cada molécula do polissacarídeo liga grande quantidade de água, devido ao alto número de grupos hidroxilas presente em sua molécula (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

A parede celular das plantas é altamente organizada, apresentando diferentes polissacarídeos, além de proteínas e substâncias aromáticas. Os polissacarídeos da parede celular consistem, principalmente, de diferentes pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-glucose, D-manose, D-galactose), ácidos urônicos (ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, ácido D-4-O-metil-glucurônico) ou pequenas quantidades de desoxi-hexoses (L-ramnose, L-fucose) (WALDRON; FAULDS, 2007).

A parede celular primária é encontrada em células jovens, sendo de fundamental importância no processo de expansão celular (REID, 1997). É também observada em células de tecidos suculentos e parenquimáticos das folhas e frutos (FRESHOUR et al., 1996). A composição química da parede celular primária de dicotiledôneas é de, aproximadamente, 25-40% de celulose, 15-25% de hemicelulose, 15-40% de substâncias pécicas, 5-10% proteínas

e traços de compostos fenólicos(AVIGAD; DEY, 1997). Já parede celular secundária encontra-se entre a primária e a membrana plasmática da célula, confere rigidez aos tecidos vegetais(REID, 1997). Em dicotiledôneas, esta é constituída de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e traços de pectina(AVIGAD; DEY, 1997).

Do ponto de vista químico, as pectinas, a celulose e as hemiceluloses podem ser diferenciadas desde as formas de extração. As pectinas são extraídas por meio de soluções aquosas de oxalato de amônio ou EDTA, as quais são capazes de quelar o cálcio ou outros cátions metálicos divalentes. As hemiceluloses são mais difíceis de serem removidas da parede celular, requerendo-se, além do uso de água, o uso de soluções alcalinas, como hidróxido de sódio ou potássio. A celulose por sua vez é obtida a partir dos resíduos da extração de pectinas e hemiceluloses sendo, portanto, não solúvel em meio básico(AVIGAD; DEY, 1997).

Os polissacarídeos apresentam diversas vantagens em relação aos polímeros sintéticos. Além dos polissacarídeos serem abundantes e prontamente disponíveis, os mesmos são obtidos a partir de fontes renováveis e comestíveis como algas, plantas ou a partir de culturas microbianas de cepas selecionadas e produzidas por técnicas de DNA recombinante, também renováveis(FILHO, 2009; JANI et al., 2009). Estes biopolímeros tem uma grande variedade de composições e propriedades que dificilmente podem ser mimetizadas em laboratórios químicos (FILHO, 2009).

A facilidade de obtenção faz com que muitos polissacarídeos e mucilagens de plantas tenham menor custo em comparação a polímeros sintéticos, com a vantagem de serem biodegradáveis(NISHINARI; TAKAHASHI, 2003; COVIELLO *et al.*, 2007; JANI *et al.*, 2009). A viscosidade de uma solução, a uma dada concentração e uma dada massa molecular,

será geralmente maior para polissacarídeos quando comparados a polímeros sintéticos de igual concentração e igual massa molecular(RINAUDO, 2001; FILHO, 2009).

A mucilagem obtida de plantas é uma substância translúcida, amorfa e polimérica, com estrutura da molécula formada por monossacarídeos. Muitas mucilagens possuem a cadeia monossacarídica combinada com ácidos urônicos e a hidrólise da mesma fornece uma mistura de açúcares e ácidos urônicos. A mucilagem contém grupos hidrofílicos que podem se combinar com água para formar soluções viscosas ou géis (JANI et al., 2009).

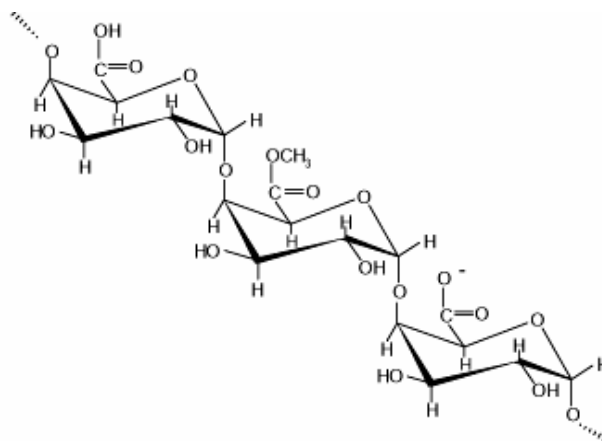
Células mucilaginosas e de produção de mucilagem são caracteres adaptativos das cactáceas ao ambiente xerófito, uma vez que a mucilagem está relacionada ao armazenamento de água(TRACTENBERG; MAYER, 1981; MAUSETH, 1993). A mucilagem obtida de cactos é descrita como um polissacarídeo tipo pectina solúvel em água(CÁRDENAS; HIGUERA-CIAPARA; GOYCOOLEA, 1997).

As mucilagens também são descritas como substâncias poliméricas complexas originadas de carboidratos, com uma estrutura altamente ramificada que contém proporções variáveis de L-arabinose, D-galactose, L-ramnose e D-xilose, bem como ácido galacturônico em diferentes proporções. A estrutura da mucilagem apresenta duas frações distintas solúveis em água. Uma fração é a pectina com propriedades gelificantes na presença do íon cálcio e a outra é a mucilagem sem propriedades gelificantes (GOYCOOLEA; CARDENAS, 2003).

A estrutura química da pectina é constituída de uma cadeia principal linear de unidades repetidas de ácido D-galacturônico ligados covalentemente por ligações α - (1,4), onde os grupos carboxílicos podem ser metil esterificados em diferentes extensões (Figura 2). Essa cadeia principal pode ser interrompida por unidades de L-ramnose através de ligações α - (1,2), às quais estão ligadas cadeias laterais, formadas por açúcares neutros, principalmente

unidades de galactose e arabinose(BRANDÃO; ANDRADE, 1999; LEVIGNE; RALET; THIBAUT, 2002; KJONIKSEN; HIORTH; NYSTROM, 2005; YAPO *et al.*, 2007).

Figura 2. Cadeia linear de ácido D-galacturônico, típica de pectinas.



FONTE: BRANDÃO; ANDRADE, 1999.

As pectinas são os componentes principais da maioria das paredes celulares de plantas superiores, eles são particularmente prevalentes em frutas e vegetais. Pectinas comerciais são preparadas na sua maioria a partir de alguns subprodutos da indústria alimentar, tais como a polpa de maçã, cascas de plantas cítricas, e polpa de beterraba. As pectinas são a classe mais complexa de polissacáridos da parede celular vegetal(IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005).

As pectinas são formadas por três principais frações: a fração linear conhecida como homogalacturonana (HG) e as frações ramificadas conhecidas como ramnogalacturonana I (RG-I) e galacturonanas substituídas (GS), dentre as quais encontra-se a ramnogalacturonana II (RG-II)(WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

As HG são polímeros que apresentam uma cadeia linear constituída por unidades de ácido α -D-galacturônico, unidas por ligações do tipo α 1 \rightarrow 4, sendo alguns grupamentos carboxílicos esterificados por metanol (ésteres de metil), razão pela qual são mais resistentes à hidrólise(O'NEILL; ALBERSHEIM; DARVILL, 1990)

As RG-I são uma classe de polissacarídeos que contém a cadeia principal constituída por unidades alternadas de ácido α -D-galacturônico ligadas em C-4 e unidades de α -L-ramnose ligadas em C-2, formando o dissacarídeo [\rightarrow 4) α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow] repetidas vezes (O'NEILL; ALBERSHEIM; DARVILL, 1990; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001). Dependendo da fonte de pectinas, 20 a 80% de resíduos de ramnose podem ser ramificados em O-4, com as cadeias laterais que variam em comprimento e composição. As ramificações laterais podem ser compostas de arabinanas, galactanas e arabinogalactanas tipo I (IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005).

As GS representam um grupo diverso de polissacarídeos que apresentam a cadeia principal constituída por unidades de ácido α -D-galacturônico, unidas por ligações do tipo 1 \rightarrow 4 (O'NEILL; ALBERSHEIM; DARVILL, 1990; IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005). No caso específico das ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II), as cadeias laterais são, geralmente, substituintes em C-2 das unidades de α -D-GalpA e são formadas por oligossacarídeos contendo ramnose e açúcares pouco usuais, como a fucose, o ácido acérico, a apiose e o ácido 3- deoxi-mano-octulosônico (IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005).

Os grupos de ácido carboxílico em galacturonanas podem ser metil esterificados, sendo que o grau de esterificação tem um efeito importante sobre a conformação e propriedades de solução da pectina. Com base no grau de esterificação, as pectinas são divididos em duas categorias: pectinas de baixo grau de metilação, que contêm menos de 50% de metil ésteres, e as de alto grau de metilação com mais que 50% de ésteres metílicos (IZYDORCZYK; CUI; WANG, 2005).

As arabinogalactanas estão presentes em vegetais superiores e são consideradas um polissacarídeo estrutural, podendo também formar as cadeias laterais das RGI, (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983). São polímeros com alto grau de ramificação e de alto peso

molecular(HAUER; ANDERER, 1993).As arabinogalactanas são encontradas em diversas plantas, e está presente em folhas, caules, raízes, flores, sementes e, em alta quantidade, em gomas e exsudatos de vegetais(MENESTRINA et al., 1998; DELGOBO et al., 1999).

De acordo com as diferenças nas ligações químicas envolvidas na formação da cadeia principal as arabinogalactanas de plantas superiores podem ser divididas em dois grandes grupos. As arabinogalactanas tipo I (AG-I) apresentam cadeia principal de (1→4)-β-D-galactopiranoose(Figura 3A),enquanto as arabinogalactanas tipo II(AG-II) possuem cadeia principal formada por (1→3) e (1→6)-β-D-galactopiranoose(Figura 3B)(ASPINALL, 1973).

As AG-I podem ser também denominadas de pécticas, visto que são encontradas como cadeias laterais que ramificam as pectinas (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983; KACURAKOVA *et al.*, 2000). Na maioria das vezes, as unidades de arabinose estão ligadas no *O*-3 das galactoses(CARPITA; GIBEAUT, 1993). As AGI apresentam grande variabilidade na composição monossacarídica, na massa molar e nas ligações glicosídicas que compõem as cadeias laterais destas moléculas (CAPEK et al., 2003; DIALLO et al., 2003; CIPRIANI et al., 2004; KARDOSOVA et al., 2004).

As AG-II apresentam cadeia principal formada por unidades de galactose (1→3) ligadas substituídas em *O*-6 por cadeias de β-D-galactose (1→6) ligadas. As unidades de galactose se encontram quase sempre substituídas em *O*-3 e *O*-6 por unidades de arabinofuranose(CARPITA; GIBEAUT, 1993). Apesar de apresentarem uma estrutura geral semelhante, a estrutura fina dasarabinogalactanas tipo II varia muito com a espécie (CARPITA; GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM *et al.*, 1996). Além de galactose e arabinose, estas estruturas podem apresentar monossacarídeos ácidos como ácido glucurônico, ácido 4-*O*-metil-glicurônico e ácido galacturônico. As arabinogalactanas tipo II estão presentes na parede celular vegetal, ramificando ou não as ramnogalacturonanas I(STEPHEN, 1983).

1.3.1. Polissacarídeos e atividade antiúlcera

A úlcera péptica é uma classificação ampla de condições mais específicas, conhecidas como úlceras gástricas e duodenais. Úlceras são clinicamente caracterizadas como uma erosão do revestimento da mucosa do trato gastrointestinal(SANTAR; KISS; BRIESTENSKY, 2000). A etiologia da úlcera gástrica ainda não está totalmente elucidada(DONATINI et al., 2009), mas sabe-se que ocorre um desequilíbrio entre fatores agressivos (secreção de ácido e pepsina) e os fatores citoprotetores da mucosa gástrica (secreção de bicarbonato, secreção de muco e produção de prostaglandinas)(BORRELLI; IZZO, 2000). Infecções por *Helicobacter pylori*, uso de medicamentos que induzem úlcera (tais como anti-inflamatórios), distúrbios na secreção, estresse, consumo de cigarros e bebidas alcoólicas contribuem para a formação de úlceras gástricas(SANTAR; KISS; BRIESTENSKY, 2000; WALLACE; SHARKEY, 2012).

O uso de medicamentos para o tratamento da úlcera gástrica promove a cura rápida e reduz a possibilidade de complicações (SANTAR; KISS; BRIESTENSKY, 2000), sendo comumente utilizados antiácidos, anticolinérgicos, inibidores da bomba de prótons, antagonistas do receptor H₂ e antibioticoterapia para o tratamento (SANTAR; KISS; BRIESTENSKY, 2000; RANG *et al.*, 2004). Entretanto, o uso destes fármacos levam a reações adversas graves(SANTAR; KISS; BRIESTENSKY, 2000; DONATINI *et al.*, 2009) e não evitam reincidências da doença (SANTAR; KISS; BRIESTENSKY, 2000).

Os polissacarídeos isolados de diversas plantas tais como *Cochlospermum tinctorium*(NERGARD et al., 2005); *Angelica sinensis*(YE et al., 2003) e *Strychnos potatorum*(SANMUGAPRIYA; VENKATARAMAN, 2007), *Chenopodium quinoa*(CORDEIRO et al., 2012), *Maytenus ilicifolia*(CIPRIANI et al., 2004; CIPRIANI et al., 2009b), *Opuntia ficus*(GALATI et al., 2007), *Cereus peruvianus*(TANAKA et al., 2010)e

do farelo de soja (CIPRIANI *et al.*, 2009a) demonstraram promissoras atividades antiúlcera. Entre as plantas citadas, sabe-se que para *Chenopodium quinoa*, *Cereus peruvianus* e para o farelo de soja o polissacarídeo isolado foi uma arabinogalactana e para *Maytenus ilicifolia* um ácido poligalacturônico.

Pressupõe-se que o mecanismo para o efeito gastroprotetor dos polissacarídeos é devido à capacidade destes polímeros em se aderir à superfície da mucosa gástrica, atuando como uma eficaz barreira inibidora da erosão da mucosa. Outros possíveis mecanismos para o efeito gastroprotetor dos polissacarídeos são: atividade antissecretora de suco gástrico, proteção da mucosa pelo aumento da síntese de muco e sequestro de radicais livres (YAMADA, 1994; MATSUMOTO *et al.*, 2002; NERGARD *et al.*, 2005).

Acredita-se que a presença de polissacarídeos aniônicos que contêm ácidos urônicos possa por si só serem aplicados para fins de tratamento, com a vantagem de satisfazer várias funções no trato gastrointestinal. Devido ao cátion ligado é possível a neutralização da acidez em excesso dos ácidos gástricos, além de atuar como eficiente hemostático no caso de complicações hemorrágicas. Ele pode ainda ser associado a substâncias ativas, atuando como transportador de antagonistas da histamina, supressores de ácidos gástricos, inibidores da bomba de prótons, antibióticos (claritromicina) ou cátions de neutralização. Outra vantagem importante é a de que a película formada proporciona uma proteção a longo prazo da membrana da mucosa duodenal ou gástrica, podendo liberar gradualmente, e de maneira controlada, as substâncias ativas ligadas a ele (SANTAR; KISS; BRIESTENSKY, 2000).

Polissacarídeos pécticos, obtidos por extração aquosa, estão entre os principais envolvidos com a atividade antiúlcera gástrica atribuída a polissacarídeos (SUN; MATSUMOTO; YAMADA, 1992b; YAMADA, 1994; NERGARD *et al.*, 2005). Desta maneira, presume-se que a partir da extração aquosa branda popularmente utilizada para a

produção de chá, tal como a infusão, polissacarídeos possam ser obtidos e, então, colaborar para a atividade farmacológica da cultura de calos de *Cereus peruvianus*, já descrita anteriormente por Tanaka et al. (2010) para a planta.

2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Devido à diversidade de aplicações dos polissacarídeos obtidos da planta *Cereus peruvianus*, a importância e a justificativa da realização desta pesquisa estão embasadas em novas perspectivas para a obtenção dos mesmos por meio da cultura de calos do cacto. Esta, por sua vez, representa uma fonte alternativa para produção dos polissacarídeos em escala industrial, garantindo uma produção programada conforme a demanda de uso, sem interferências climáticas e dentro da própria indústria.

Para tanto, a caracterização química do polissacarídeo presente na cultura de calos é um requisito importante para as análises farmacológicas e futuras aplicações industriais deste polímero.

Desta maneira, com base na ampla aplicabilidade e alto valor econômico da goma viscosa do cacto *Cereus peruvianus*, o presente trabalho pretende contribuir cientificamente para a viabilidade, estudos químicos e farmacológicos de uma fonte nova de polissacarídeos de interesse.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o polissacarídeo obtido a partir da cultura de calos de *Cereus peruvianus* e avaliar a sua atividade farmacológica antiulcerogênica, visto que esta atividade já foi descrita para extratos da planta.

3.1. Objetivos Específicos

- Extrair o polissacarídeo da cultura de calos de *Cereus peruvianus* por extração aquosa;
- Purificar o polissacarídeo obtido;
- Caracterizar quimicamente o polissacarídeo obtido por métodos espectrofotométricos e cromatográficos;
- Avaliar a atividade gastroprotetora do polissacarídeo por dois modelos experimentais de indução de úlcera: a) administração intragástrica de etanol, b) injeção subcutânea de indometacina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de calos

A cultura de calos de *Cereus peruvianus* (Figura 4) utilizados neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese de Vegetais coordenado pela Prof^a. Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado, do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá. O cultivo foi realizado 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; SKOOG, 1962) (Anexo A) suplementado com vitaminas B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968), sacarose 3%, ágar 0,8%, além de água de coco 15% e $4,0 \text{ mgL}^{-1}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e $4,0 \text{ mgL}^{-1}$ de N-6-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.

Figura 4. Cultura de calos de *Cereus peruvianus*.



4.2. Obtenção dos polissacarídeos

4.2.1. Deslipidificação e despigmentação

A cultura de calos de *C. peruvianus*(50g) previamente liofilizada foi submetida à deslipidificação e despigmentação com clorofórmio-metanol (2:1 v/v; 1L) em extrator Soxhlet por 4 horas. Na sequência iniciou-se o processo de extração dos polissacarídeos.

4.2.2. Extração aquosa

O resíduo seco, deslipidificado e sem clorofila foi submetido à extração aquosa na proporção de biomassa seca e água 1:60 (p/v) à 50°C por 3 horas, esse processo foi repetido 3 vezes. Após cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente. O material foi reunido, concentrado em rotaevaporador à 50 ° C até pequeno volume e precipitado com etanol (1:3, v/v), com a finalidade de separar as moléculas de alta massa molar (precipitado) dos componentes de baixa massa molar(sobrenadante)para obtenção do polissacarídeo PAG. Os precipitados etanólicos obtidos foram filtrados, ressuspensos e dialisados em membranas 10 kDa em água por 4 dias. Após a diálise, devido à separação de fases, a amostra foisubmetida a um processo de purificação por congelamento e descongelamento(GORIN; IACOMINI, 1984)(Ver Item 4.3.1.).

4.3. Purificação do polissacarídeo

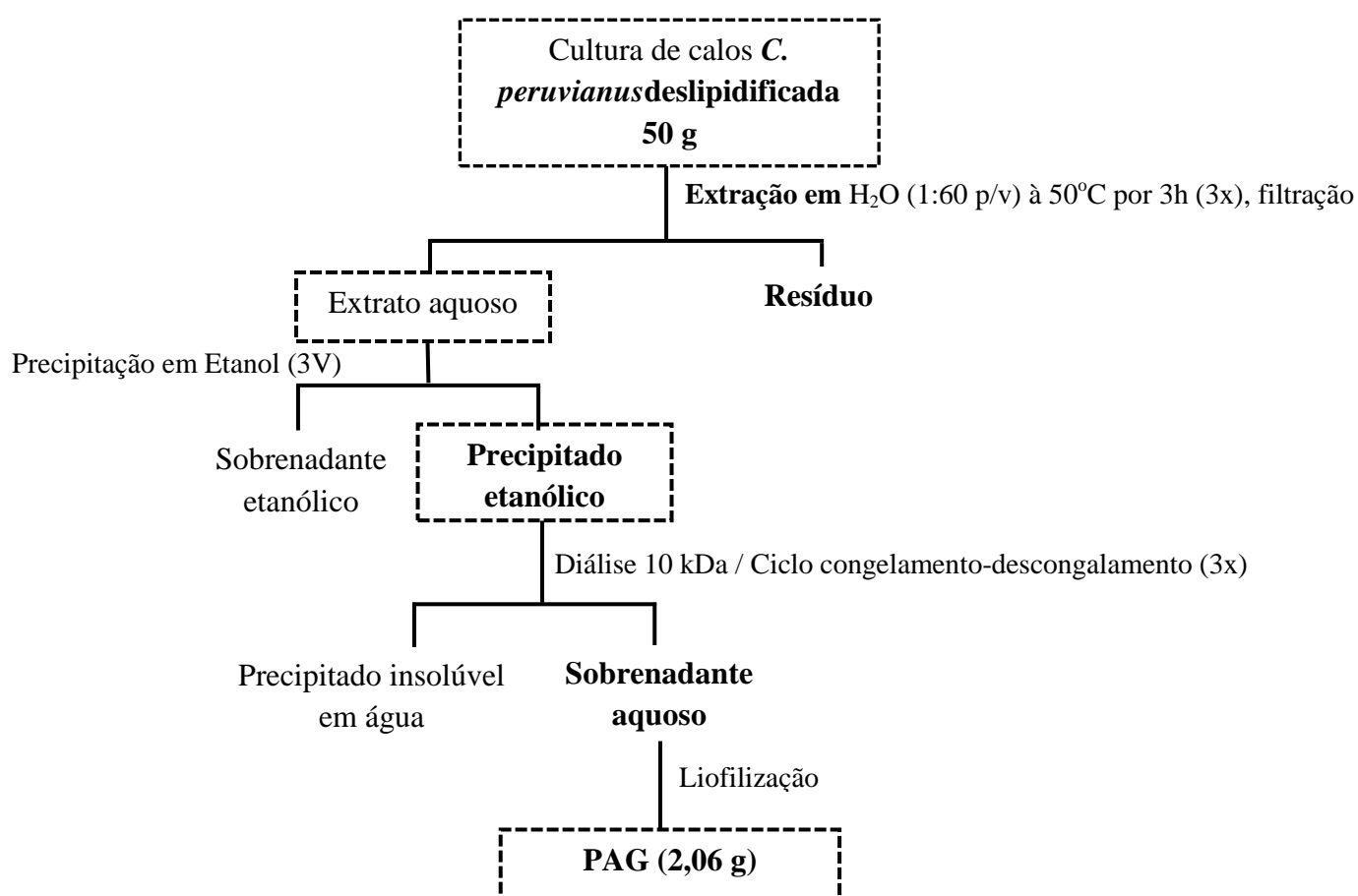
4.3.1. Separação dos polissacarídeos por congelamento e descongelamento

A fração obtidapela extração aquosa foi submetida ao processo de purificação por congelamento e descongelamento(GORIN; IACOMINI, 1984).O extrato solubilizado em água destilada foi congelado e, posteriormente,descongelado à temperatura ambiente. O

precipitado, insolúvel em água fria, foi separado por centrifugação (4500 rpm, 25 minutos, 5°C). Este processo foi repetido diversas vezes, até que os sobrenadantes aquosos não apresentassem mais precipitado. Após esta etapa, os sobrenadantes foram reunidos, concentrados e liofilizados.

Na Figura 5 a seguir está descrito o procedimento geral de extração e purificação dos polissacarídeos da cultura de calos de *Cereus peruvianus*.

Figura 5. Fluxograma do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos pela extração aquosa à quente da cultura de calos de *C. peruvianus*.



4.4. Composição Monossacarídica do polissacarídeo isolado

A composição monossacarídica do polissacarídeo foi realizada em Cromatógrafo em fase Gasosa acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) após hidrólise, redução e acetilação. Os monossacarídeos foram identificados pelos seus respectivos valores de tempo de retenção e perfis de fragmentação (WOLFROM; THOMPSON, 1963a; WOLFROM; THOMPSON, 1963b).

4.4.1. Hidrólise ácida total

Uma alíquota do PAG (~1,0 mg) foram tratadas com 200 µL de TFA 2 molL⁻¹, durante 8 horas, a 100 °C, em tubos hermeticamente fechados. Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras por evaporação em fluxo de ar à temperatura ambiente (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989).

4.4.2. Redução e acetilação dos produtos de hidrólise

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH₄) à temperatura ambiente após o ajuste do pH a 9-10, por 15 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Após esse período, as amostras reduzidas foram evaporadas em fluxo de ar. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol, na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético/piridina (1:1, v/v), “overnight”, à temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Os acetatos de alditóis formados foram extraídos com clorofórmio e a piridina residual presente neste extrato foi removida por meio de sucessivas extrações com uma solução de sulfato de cobre 5% (m/v). Após remoção total da piridina, a fração clorofórmica foi desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada. Após evaporação, os acetatos de alditóis isolados foram

analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) (WOLFROM; THOMPSON, 1963a; WOLFROM; THOMPSON, 1963b).

4.5. Teste de Homogeneidade

4.5.1. Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS)

Para a análise de homogeneidade, PAG foi solubilizado em uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) contendo azida de sódio (NaN_3) para uma concentração final de $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$. A amostra foi filtrada em membrana de acetato de celulose 0,22 μm (Millipore®). Estas foram injetadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) Waters equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo Waters 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-Fdo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR (UFPR). Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação WATERS com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da.

4.6. Análises Químicas

4.6.1. Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para estimar a composição monossacarídica e a presença de ácidos urônicos no polissacarídeo PAG hidrolisado. A amostra hidrolisada (item 4.4.1) foi analisada por CCD em placas de alumínio revestida de gel de sílica (60G - MERCK). A amostra e os padrões foram diluídas em água na concentração de 1 mgmL^{-1} e aplicadas na placa. A fase móvel utilizada foi acetato de etila,

propanol, ácido acético e água (4:2:2:1, v/v/v/v), e as placas foram reveladas com reagente de orcinol (0,2 g de orcinol, em 95 mL de etanol e 5 mL de H₂SO₄)(SASSAKI *et al.*, 2008).Foram utilizados padrões analíticos de alta pureza (SIGMA[®]) dos monossacarídeos GalA,GlcA, Ara, Gal, Man, Rha.

4.6.2. Cromatografia em fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

Os componentes monossacarídicos foram quantificados em Cromatógrafo Gasoso Varian[®]3800acoplado a um espectrômetro de massa tipo *Ion-Trap* modelo Saturn 2000R do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR (UFPR). A coluna utilizada foi apolar do tipo capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm). A eluição foi desenvolvida utilizando gás Hélio como gás de arraste, a um de fluxo de 1,5 mLmin⁻¹. A programação de temperatura iniciou-se em 50° C por 1 min, sendo aumentada até 220° C (alditóis acetatos), ou 215° C (alditóis acetatos parcialmente *O*-metilados), a uma taxa de 40°Cmin⁻¹, mantida isotermicamente por 19,15 min. Os espectros foram analisados por comparação com a literatura e por comparação com a biblioteca de espectros do equipamento, e a quantificação foi determinada pelas áreas dos picos(SASSAKI *et al.*, 2005).

4.7. Determinaçõesespectrofotométricas

Todas as análises químicas determinadas espectrofotometricamente foram realizadas no espectrômetro Varian Cary Modelo 1E UV-VIS, do Laboratório de Análises Físico-Químicas de Medicamentos e Correlatos – LAFQ-MED. O cálculo de conversão das absorbâncias em concentração foi realizado a partir da equação de regressão linear obtida a partir da curva de calibração para cada metodologia, todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.7.1. Dosagem de açúcar total

A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS; GILLES; HAMILTON, 1956). O princípio desta técnica baseia-se na ação do ácido sulfúrico sobre o açúcar, que perde duas moléculas de água para formar o derivado hidroximetilfurfural (para as hexoses) ou furfural (para as pentoses). Estes reagem com o fenol formando uma coloração amarelo-alaranjado que é medida em 490 nm.

O método consistiu na adição de 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado em 1,0 mL de solução da amostra em concentração previamente estabelecida ($50\mu\text{g mL}^{-1}$), sob agitação vigorosa. Estas soluções foram aquecidas em “banho-maria” durante 10 minutos, e a seguir resfriadas.

4.7.2. Dosagem de proteínas totais

Os teores de proteínas foram determinados pelo método de Lowry Modificado (HARTREE, 1972). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II). Em 1 mL de amostra ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado 0,9 mL do reagente A (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 100 g de Na_2CO_3 em 500 mL de NaOH 1M são dissolvidos em 1000 mL de água destilada q.s.p.). A solução permaneceu em “banho-maria” a 50 °C durante 10 minutos. Em seguida ela foi resfriada até temperatura ambiente e adicionou-se 0,1 mL do reagente B (2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 90 mL de água destilada, sobre os quais se adicionam 10 mL de NaOH 1M), permanecendo 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 3 mL do reagente C (1 mL de reagente de Folin Ciocalteu 2 N diluído em 15 mL de água destilada, sendo o volume final 16 mL), e a solução

permaneceu em banho-maria a 50 °C durante 10 min e em seguida foi resfriada à temperatura ambiente. A soroalbumina bovina (SIGMA[®]) nas concentrações de 5-60 µgmL⁻¹ foi utilizada como padrão e a coloração foi lida em 650 nm.

4.7.3. Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácido urônico foi realizada por método descrito por Filisetti-Cozzi (FILISETTI-COZZI; CARPITA, 1991). O ensaio baseia-se na reação dos ácidos urônicos, em ambiente fortemente ácido, com o *m*-hidroxibifenil para formar complexos de cor rosa. Em 400 µL de amostra foram adicionados 40 µL de solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) e 2,4 mL de tetraborato de sódio em ácido sulfúrico. A mistura foi aquecida em "banho maria" fervente por 20 min. Após resfriamento, 80 µL de *m*-hidroxibifenil (0,15% m/v em NaOH 0,5% m/v) foram adicionados e a coloração, estável até 1 hora após sua formação, foi lida em 525 nm. Ácido galacturônico foi utilizado como padrão, nas concentrações de 2 a 30 µg mL⁻¹.

4.8. Atividade antiúlcero-gênica gástrica

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Universidade Estadual de Maringá, supervisionados pela Prof. Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado.

Ratos da linhagem Wistar, com peso entre 200 à 220g fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Maringá foram utilizados. Os animais para experimentação foram mantidos em caixa apropriada no Biotério Setorial do Laboratório de Inflamação, durante 3

dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12h, recebendo dieta *ad libitum* até o experimento.

A atividade antiulcerogênica foi avaliada em dois modelos experimentais. No primeiro modelo, as lesões foram induzidas por administração intragástrica de etanol (0,5 mL/200g rato) em ratos sob jejum de 24 h, como descrito previamente por Robert et al. (1979). Neste modelo os ratos foram divididos em 5 grupos (n= 6 animais), sendo um grupo controle positivo tratado com cimetidina via oral (dose de 100 mg kg⁻¹ de peso corporal), grupos tratados com polissacarídeo PAG via oral nas doses de 30 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹, 200 mg kg⁻¹ e um grupo controle negativo utilizando o veículo por via oral (água 0,1 mL/100 g de peso corporal do animal).

Após 1 hora de cada tratamento respectivo foi administrado via intragástrica etanol P.A. (0,5 mL/200g rato). Os animais foram então eutanasiados 1 hora após a administração do etanol para avaliação das lesões (ROBERT et al., 1979).

No segundo modelo as lesões gástricas foram induzidas por injeção subcutânea de indometacina (30 mg/kg), como descrito no método de Aguwa & Mittal (1981). Os ratos com úlcera induzida por indometacina foram divididos também em 5 grupos (n= 6 animais), sendo um grupo controle positivo tratado com cimetidina via oral (dose de 100 mg kg⁻¹ de peso corporal), grupos tratados com polissacarídeo PAG via oral nas doses de 30 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹, 200 mg kg⁻¹ e um grupo controle negativo utilizando o veículo via oral (água 0,1 mL/100 g de peso corporal do animal).

Após 1h de cada respectivo tratamento, as lesões foram induzidas por injeção subcutânea de indometacina (30 mg kg⁻¹). Quatro horas após a indução da úlcera os ratos foram eutanasiados para avaliação das lesões (AGUWA; MITTAL, 1981).

4.8.1. Avaliação das lesões

Os estômagos de todos os ratos foram removidos e abertos, e sua superfície interna analisada. A mucosa foi lavada cuidadosamente com solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) e analisada macroscopicamente. As lesões gástricas foram quantificadas, e o índice médio de ulceração (IU) calculado da seguinte forma (BERSANI-AMADO et al., 2000):

$$IU = \frac{(n \text{ lesão I}) + (n \text{ lesão II}) \cdot 2 + (n \text{ lesão III}) \cdot 3}{n \text{ animais}}$$

n animais

Onde:

n = número

I = presença de edema, submucosa, hiperemia, hemorragias puntiformes (petéquias) (menor que 1 mm);

II = presença de submucosa, lesões hemorrágicas com pequenas erosões (1 a 3 mm);

III = presença de úlcera profunda com erosões e lesões invasivas (maior que 3 mm) (SZELENYI; THIEMER, 1978).

A análise estatística de variância (ANOVA) para a taxa de lesão gástrica forneceu a interpretação para os dados obtidos. Diferenças sequenciais entre médias foram calculadas a um nível de $p < 0,05$ utilizando teste de Tukey.

A dose efetiva 50% (DE50) foi calculada usando o Origin 7, por meio da curva de dose-resposta hiperbólica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e purificação

A cultura de calos de *Cereus peruvianus* foi liofilizada, sendo a porcentagem de água presente igual a 93%. Partindo-se de 50g do material seco foi realizada a extração aquosa e os polissacarídeos brutos obtidos a partir desta foram separados dos componentes de baixa massa por tratamento com etanol, o qual resultou em um precipitado. Este, por sua vez, foi submetido à diálise e, posteriormente, ao processo de fracionamento por congelamento e descongelamento. O sobrenadante resultante deste processo, que contém os polissacarídeos solúveis em água fria foi liofilizado e denominado PAG (Figura 6). O rendimento após este procedimento de extração foi de 2,06 g (4,11%). A extração e as etapas de purificação dos polissacarídeos são mostradas resumidamente na Figura 5.

Figura 6. Polissacarídeo PAG liofilizado.



5.2. Caracterização química do PAG

A amostra PAG apresentou um teor de proteínas inferior a 1% e de açúcares totais igual a 53,4%. Com relação à sua composição monossacarídica, PAG apresentou Gal, Ara, ácido urônico e Xil na proporção de 71:15:9:5, além de traços de Rha. Os cromatogramas e espectros de massas estão apresentados no Apêndice A.

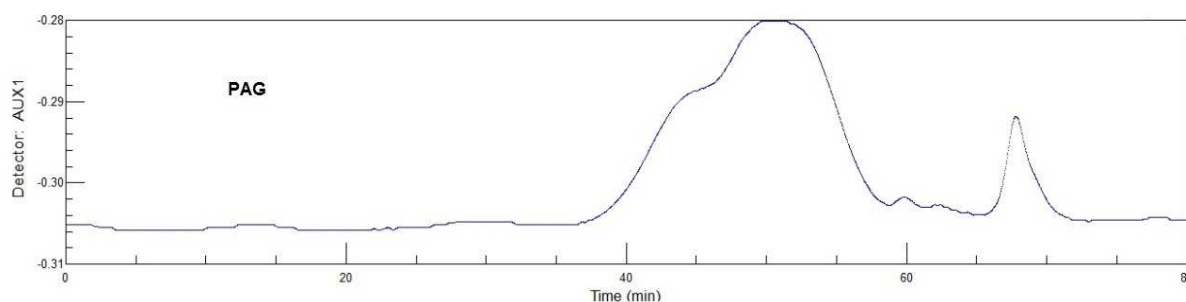
Em trabalho semelhante com a planta *C. peruvianus*, Tanaka et al. (2010) a composição obtida para os polissacarídeos brutos foram Gal, Ara, Rha e ácido urônico na proporção 66:15:13:6. O monossacarídeo majoritário é a Gal tanto para a cultura de calos de *C. peruvianus* quanto para a planta, assemelhando-se a proporção de Gale Ara (66:15) relatada por Tanaka et al (2010). A ausência de Rha na cultura de calos deve-se provavelmente a falta de constituintes precursores deste monossacarídeo no meio de cultura utilizado para o desenvolvimento dos calos. Já a presença de xilose pode ser um interferente proveniente de hemicelulosesco-extraídas com o PAG ou pode estar realmente ligada à estrutura do polissacarídeo.

O perfil da composição monossacarídica do PAG sugere que provavelmente este polissacarídeo poderia ser uma arabinogalactana, tal como o encontrado originalmente na planta por Tanaka et al (2010).

Em análise por HPSEC-MALLS, o PAG apresentou-se heterogêneo, como pode ser observado na Figura 7 pela presença de dois picos sobrepostos nos tempos de retenção entre 40-60 minutos. O pico com tempo de retenção em torno de 65-70 minutos provavelmente é referente ao pico da água presente na amostra.

Figura 7. Perfil de eluição em HPSEC-MALLS do polissacarídeo

PAG.



5.2. Avaliação da atividade antiulcerogênica de PAG

Atualmente diversos trabalhos têm demonstrado que os polissacarídeos obtidos de plantas apresentam propriedade antiulcerogênica gástrica (SUN; MATSUMOTO; YAMADA, 1992b;1992a; YAMADA, 1994; YE *et al.*, 2003; CIPRIANI *et al.*, 2004; NERGARD *et al.*, 2005; SANMUGAPRIYA; VENKATARAMAN, 2007; TANAKA *et al.*, 2010). Entre as Cactáceas, conhecidas pela alta produção de mucilagens, já foi descrito a atividade preventiva e curativa de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos tratados com os polissacarídeos de *Opuntia ficus indica* (GALATI *et al.*, 2001; GALATI *et al.*, 2002). Recentemente, Tanaka *et al* (2010) demonstraram que a arabinogalactana tipo I extraída de *Cereus peruvianus* possui ação inibitória sobre formação de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.

A extração à quente, um simples processo de infusão, da cultura de calos de *Cereus peruvianus* extrai cerca 4,11% de polissacarídeos em relação à massa total de calos secos. O polissacarídeo obtido, caracterizado como sendo uma arabinogalactana, pode ser ingerido na forma simples de um chá.

Desta forma, com o objetivo de determinar se as propriedades biológicas de *C. peruvianus* podem ser reproduzidas também para a da cultura de calos, foi avaliada a atividade antiúlcero gênica do polissacarídeo PAG.

O pré-tratamento dos ratos, por via oral, com o polissacarídeo PAG reduziu as lesões gástricas induzidas por etanol (Figura 8), sugerindo uma possível ação citoprotetora. O índice de úlcera em ratos controles, no modelo induzido por etanol foi de $59,82 \pm 4,04$ (média \pm erro médio padrão). O pré-tratamento dos ratos com a dose de 30 mg.kg^{-1} e 100 mg.kg^{-1} reduziu os danos gástricos induzidos por etanol para $56,43 \pm 6,45$ e $43,00 \pm 4,61$, representando uma redução de 5,7% e 28,2% respectivamente. O tratamento com a dose de 200 mg.kg^{-1} , reduziu o índice de úlcera para $34,71 \pm 3,88$, com porcentagem de inibição de 41,87% (Tabela 1). Estes resultados mostraram que o efeito apresenta uma relação dose-dependente.

O efeito do polissacarídeo PAG na dose de 200 mg.kg^{-1} é comparável ao produzido pela cimetidina ($32,17 \pm 5,15$), fármaco de referência que reduziu as úlceras em 46,22%. Além disso, o PAG na dose de 200 mg kg^{-1} reduziu significativamente ($p < 0,001$) as úlceras induzidas por etanol quando comparadas ao grupo controle ($59,82 \pm 4,04$) (Tabela 1).

Figura 8. Efeito protetor de PAG ($30, 100$ e 200 mg.kg^{-1} , diluído em água, v.o.), sobre as lesões gástricas induzidas por EtOH (C: controle, água $0,1 \text{ ml}/100 \text{ g}$, v.o. e Cim: cimetidina 100 mg/kg , diluída em salina $0,9\%$, v.o.). Os resultados são expressos como média \pm erro médio padrão ($n = 6$). ^a $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

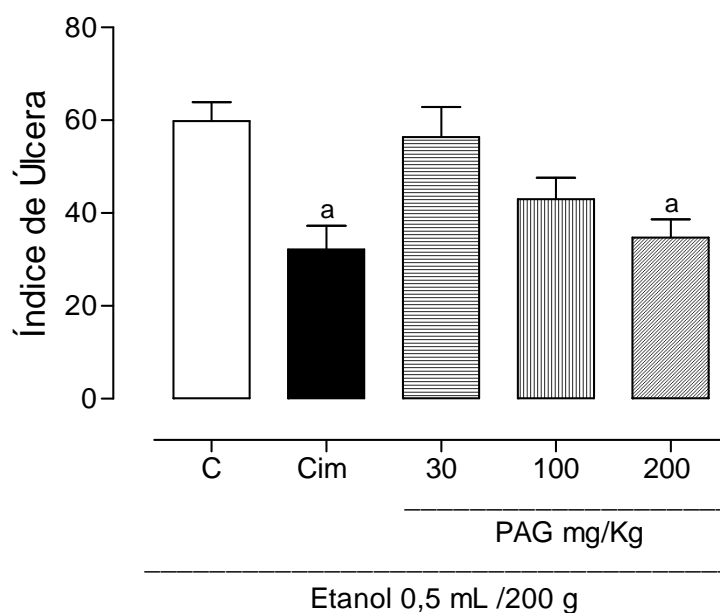


Tabela 1. Efeito do polissacarídeo PAG extraído da cultura de calos de *C. peruvianus* nas úlceras induzidas por etanol em ratos.

Tratamento	Índice de úlcera	Inibição
Controle (água)	59,82 ± 4,04	-
PAG (30 mg.kg ⁻¹)	56,43 ± 6,45	5,7%
PAG (100 mg.kg ⁻¹)	43,00 ± 4,60	28,2%
PAG (200 mg.kg ⁻¹)	34,71 ± 3,88 ^a	41,87%
Cimetidina	32,17 ± 5,15	46,22 %

(a) Significativamente (p <0,001) diferente do grupo controle.

As lesões gástricas induzidas por etanol podem ocorrer por uma redução da secreção de bicarbonato e da produção de muco (MARHUENDA; MARTIN; DELALASTRA, 1993)

e/ou por deficiência do fluxo sanguíneo gástrico e lesão de células da mucosa (BIRDANE et al., 2007). Além disso, as lesões gástricas induzidas por etanol podem estar associadas à produção excessiva de radicais livres, que atacam constituintes celulares essenciais como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (LA CASA et al., 2000). O aumento do conteúdo de peróxidos lipídicos e radicais livres derivados de oxigênio resulta em alterações significativas em nível celular, causando danos às membranas, morte celular, esfoliação e erosão epitelial (BIRDANE et al., 2007).

Segundo alguns estudos os prováveis mecanismos para o efeito antiulcerogênico dos polissacarídeos são: atividade anti-secretora de suco gástrico, proteção da mucosa pelo aumento da síntese de muco, e também pelo efeito quelante de radicais livres (MATSUMOTO; MORIGUCHI; YAMADA, 1993; YAMADA, 1994; NERGARD *et al.*, 2005). Além disso, foi relatado que os polissacarídeos obtidos do *Opuntia ficus* formam uma camada protetora sobre a mucosa gástrica, evitando as lesões necróticas profundas e a extensa esfoliação do epitélio superficial induzido por etanol (GALATI *et al.*, 2001).

Diante destas considerações podemos sugerir que o mecanismo para o efeito antiulcerogênico dos polissacarídeos obtidos da cultura de calos de *C. peruvianus* poderia estar relacionado à propriedade destes polímeros em se aderir à superfície da mucosa gástrica, que atuaria como uma barreira inibidora da erosão da mucosa, impedindo a penetração do agente agressivo na mucosa gástrica.

O polissacarídeo PAG é formado principalmente por uma arabinogalactana e ácido galacturônico, que podem atuar sinergicamente com fatores de defesa da mucosa gástrica. A carga negativa do ácido galacturônico confere a característica de alta viscosidade do polissacarídeo PAG, podendo ocorrer interações com moléculas da mucosa gástrica. A viscosidade é influenciada pelo pH e concentração do cátion cálcio e, no lúmen gástrico, as

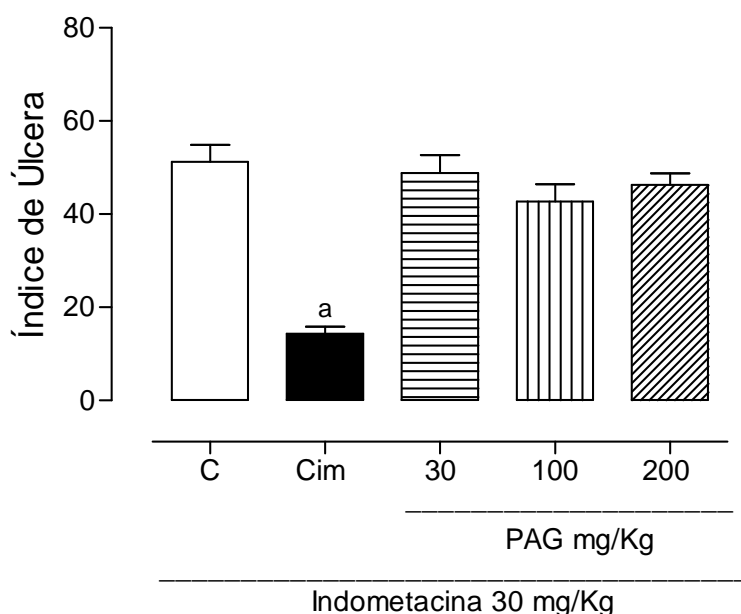
propriedades de gelificação mudam devido às alterações na conformação da molécula. Este efeito sobre a forma e conformação molecular poderia estar relacionado com a atividade protetora sobre a mucosa gástrica(SANTAR; KISS; BRIESTENSKY, 2000).

O parâmetro farmacodinâmico de dose efetiva 50% (DE_{50}) foi calculado utilizando o modelo de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$), que segue a equação: $E = E_{m\acute{a}x} [D] / DE_{50} + [D]$, onde E= efeito, D= dose(CRISTOFOLETTI; RAMA; CHIANN, 2011). Consideramos neste caso que a dose é igual a concentração do fármaco, visto que o polissacarídeo provavelmente atua como uma barreira mecânica, sem necessidade de absorção. De acordo com este modelo, com o aumento na concentração do fármaco, 'E' aproxima-se assintoticamente de ' $E_{m\acute{a}x}$ '. O modelo $E_{m\acute{a}x}$ descreve que a curva dose do fármaco *versus* efeito assume o formato de uma hipérbole a partir de uma determinada dose do fármaco, o efeito observado é máximo.

A DE_{50} para o polissacarídeo PAG extraído da cultura de calos de *Cereus peruvianus* foi de 74 mg.kg⁻¹. Utilizando o polissacarídeo extraído de *C. peruvianus in natura*, Tanaka *et al* (2010) obteve uma redução significativa na dose de 100 mgkg⁻¹ ($p < 0,001$), com uma ED_{50} de 49 mg kg⁻¹. Portanto, é possível inferir que o polissacarídeo extraído da planta apresenta um efeito antiulcerogênico mais potente que o polissacarídeo extraído da cultura de calos.

Por outro lado, o pré-tratamento por via oral com o polissacarídeo PAG não reduziu significativamente as lesões gástricas induzidas por injeção subcutânea de indometacina (Figura 9).

Figura 9. Efeito do PAG (30, 100 e 200 mg kg⁻¹, diluído em água, v.o.), sobre as lesões gástricas induzidas por injeção subcutânea de indometacina (C: controle, água 0,1 ml/100 g, v.o. e Cim: cimetidina 100 mg kg⁻¹, diluída em salina 0,9%, v.o.). Os resultados foram expressos como média \pm erro médio padrão (n = 6). ^a $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.



O índice de úlcera em ratos controles no modelo induzido por indometacina foi de $51,25 \pm 3,62$ (média \pm erro médio padrão). Nos ratos pré-tratados com as doses de 30 mg kg^{-1} , 100 mg kg^{-1} e 200 mg kg^{-1} os índices de úlceras foram de $48,86 \pm 3,84$, $42,71 \pm 3,72$ e $46,29 \pm 2,49$, representando uma redução de 4,7%, 16,7% e 9,7% respectivamente. O grupo de ratos tratados com cimetidina mostrou uma redução de 72,03 %. (Tabela 2).

As lesões gástricas induzidas por indometacina, um inibidor não seletivo de ciclooxigenase, é decorrente da inibição da síntese de prostaglandinas, as quais são responsáveis pela redução da secreção de ácido gástrico, aumento da secreção de muco e aumento do fluxo sanguíneo local (WALLACE, 2001).

Tabela 2. Efeito do polissacarídeo PAG extraído da cultura de calos de *C. peruvianus* nas úlceras induzidas por injeção subcutânea de indometacina em ratos.

Tratamento	Índice de úlcera	Inibição
Controle (água)	$51,25 \pm 3,62$	-

PAG (30 mg.kg ⁻¹)	48,86 ± 3,84	4,7%
PAG (100 mg.kg ⁻¹)	42,71 ± 3,72	16,7%
PAG (200 mg.kg ⁻¹)	46,29 ± 2,49	9,7%
Cimetidina	14,33 ± 1,48	72,03 %

Desta maneira, o polissacarídeo PAG apresentou uma atividade antiulcerogênica significativa somente no modelo experimental de úlceras induzidas por etanol, não apresentando atividade no modelo de úlcera induzida pela indometacina, indicando que o efeito protetor provavelmente não estaria relacionado à inibição da síntese de prostaglandinas gástricas, e talvez tenha relação com a formação de uma barreira protetora na mucosa gástrica.

6. CONCLUSÕES FINAIS

Após análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- O polissacarídeo PAG obtido da cultura de calos de *Cereus peruvianus* apresentou composição monossacarídica de Gal, Ara, Rha e ácido urônico na proporção 66:15:13:6.
- O perfil da composição monossacarídica do PAG sugere que provavelmente este polissacarídeo poderia ser uma arabinogalactana, tal como o encontrado originalmente na planta.
- O polissacarídeo PAG extraído da cultura de calos de *C. peruvianus* apresentou atividade antiulcerogênica significativa no modelo induzido por etanol. A ausência de atividade no modelo induzido por indometacina pode sugerir que o polissacarídeo não atuaria sobre a síntese de prostaglandinas e, portanto, não alteraria a produção de muco por esta via. O efeito gastroprotetor deste polissacarídeo provavelmente está relacionado à capacidade destes polímeros em se aderir à superfície da mucosa gástrica, atuando como uma eficaz barreira inibidora da erosão da mucosa.
- A DE_{50} para o polissacarídeo PAG extraído da cultura de calos de *C. peruvianus* foi de 74 mg kg⁻¹.
- O desenvolvimento de métodos biotecnológicos, tais como a culturas de tecidos vegetais, é uma proposta promissora para o cultivo de plantas medicinais com o intuito de obter metabólitos primários e secundário de interesse, possibilitando ainda uma produção contínua desses compostos com alta qualidade e homogeneidade em relação as matérias primas vegetais.

- Portanto, a utilização da cultura de calos de *C. peruvianus* como fonte de obtenção industrial de polissacarídeos com atividades farmacológicas é uma alternativa a colheita destrutiva da planta, possibilitando a redução da área necessária para o cultivo além de garantir um controle rigoroso durante a produção o que colabora com a homogeneidade dos efeitos biológicos produzidos.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in Carbohydrates Chemistry**, v. 5, 1965.
- AGUWA, C. N.; MITTAL, G. C. Study of antiulcer activity of aqueous extract of leaves of *Pyrenacantha standtii* (Family I cacinaceae) using various models of experimental gastric ulcer in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 74, p. 215-219, 1981.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; ONEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. **Pectins and Pectinases**, v. 14, p. 47-55, 1996.
- ALTESOR, A.; EZCURRA, E. Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. **Journal of Arid Environments**, v. 53, n. 4, p. 557-567, 2003.
- ALVAREZ, M.; COSTA, S. C.; HUBER, A.; BARON, M.; FONTANA, J. D. The Cuticle of the Cactus *Cereus peruvianus* as a Source of a Homo-Alpha-D-Galacturonan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51-2, 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* - Structural Features and Potential Uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-5, p. 283-295, 1992.
- ANDERSON, E. F. **The cactus family**. Portland, Oregon Timber Press, 2001.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina Embrapa cerrados, 2002.
- ARACE, A. Cactaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A., *et al* (Ed.). **Flowering plants of the Neotropics**: Princeton and Oxford University Press, 2004. p.73-76.
- ARIKAT, N. A. Micropropagation and accumulation of essencial oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 93-202, 2004.
- ARRUDA, E. C. P.; PINNA, G. F. A. M.; ALVES, C. M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 589-601, 2005.

ARRUDA, V. M. **Avaliação farmacológica das atividades antiinflamatória, analgésica e anti-ulcerogênica do fitoterápico Sanativo®**. 2008. Dissertação de mestrado Ciências da saúde, Universidade Federal de Pernambuco

ASPINALL, G. O. **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York Academic Press, 1973.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates In: DEY, P. M. e HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p.143.

BARROS, M. J.; NOZAKI, J. Pollutants abatement from effluents of paper and pulp industries by flocculation/coagulation and photochemical degradation. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 736-740, 2002.

BARTHLOTT, W.; HUNT, D. R. Cactaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.161-197.

BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S.; RICCI, E. L.; REIS-SILVA, M.; SILVA, A. C.; DALMOLIN, D. P. **Perda de peso em ratos alimentados com ração hipercalórica e tratados com o fitoterápico KOUBO®**. 2011. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BERSANI-AMADO, C. A.; MASSAO, L. B.; BAGGIO, S. R.; JOHANSON, L.; ALBIERO, A. L.; KIMURA, E. Antiulcer effectiveness of *Maytenus aquifolium* spray dried extract. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 543-5, 2000.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and the other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C. J. M., G. D. (Ed.). **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. p.27-41.

BIRDANE, F. M.; CEMEK, M.; BIRDANE, Y. O.; GULCIN, I.; BUYUKOKUROGLU, M. E. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 4, p. 607-611, 2007.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Manual de laboratório de química de alimentos**. São Paulo Livraria Varela, 2003.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p. 581-591, 2000.

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.

BRATBY, J. **Coagulation and flocculation: with an emphasis on water and wastewater treatment**. Croydon Uplands Press, 1980.

BRITTON, N. L.; ROSE, J. N. **The Cactaceae: Description and Illustrations of Plants of the Cactus Family**. New York Dover, 1963.

CAPEK, P.; HRIBALOVA, V.; SVANDOVA, E.; EBRINGEROVA, A.; SASINKOVA, V.; MASAROVA, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, n. 1-3, p. 113-119, 2003.

CÁRDENAS, A.; HIGUERA-CIAPARA, I.; GOYCOOLEA, F. M. Rheology and aggregation of cactus (*Opuntia ficus indica*) mucilage in solution. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 2, p. 152-159, 1997.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural Models of Primary-Cell Walls in Flowering Plants - Consistency of Molecular-Structure with the Physical-Properties of the Walls during Growth. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

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, n. 2, p. 687-690, 2009a.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 361-363, 2009b.

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, n. 4, p. 703-706, 2004.

CORDEIRO, L. M. C.; REINHARDT, V. D.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D.; BURCI, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: Structure and gastroprotective activity. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 937-944, 2012.

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 1, p. 5-24, 2007.

CRISTOFOLETTI, R.; RAMA, E. M.; CHIANN, C. Relação entre Farmacocinética e Farmacodinâmica (PK/PD). In: STORPIRTIS, S.; GAI, M. N., *et al* (Ed.). **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.174-179.

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 heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, n. 3-4, p. 167-175, 1999.

DEMBITSKY, V. M.; REZANKA, T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1075-1080, 1996.

DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; LILJEBACK, T. H. A.; MICHAELSEN, T. E. The malian medicinal plant *Trichilia emetica*; studies on polysaccharides with complement fixing ability. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 279-287, 2003.

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, n. 1A, p. 89-94, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, 1956.

FERNANDES, L. M.; PEREIRA, N. C.; MENDES, E. S.; LIMA, O. C. M.; COSTA, S. C. Clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni utilizando o cacto *Cereus peruvianus*. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1369-1374, 2001.

FILHO, R. P. V. **Aplicação de polissacarídeos em emulsão cosmética: análises reológicas** 2009. Dissertação de mestrado Setor de Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of Uronic-Acids without Interference from Neutral Sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-Proteins - Structure, Biosynthesis, and Function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

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

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

FOX, M. A.; WHITESELL, J. K. **Organic chemistry**. Boston Jones and Bartlett, 1994.

FRESHOUR, G.; CLAY, R. P.; FULLER, M. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; HAHN, M. G. Developmental and Tissue-Specific Structural Alterations of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Roots. **Plant Physiology**, v. 110, n. 4, p. 1413-1429, 1996.

GALATI, E. M.; MONFORTE, M. T.; MICELI, N.; MONDELLO, M. R.; TAVIANO, M. F.; GALLUZZO, M.; TRIPODO, M. M. *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. mucilages show cytoprotective effect on gastric mucosa in rat. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 344-346, 2007.

GALATI, E. M.; MONFORTE, M. T.; TRIPODO, M. M.; D'AQUINO, A.; MONDELLO, M. R. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 1-9, 2001.

GALATI, E. M.; PERGOLIZZI, S.; MICELI, N.; MONFORTE, M. T.; TRIPODO, M. M. Study on the increment of the production of gastric mucus in rats treated with *Opuntia-ficus indica* (L.) Mill. cladodes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 229-233, 2002.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GOLAN-GOLDHIRSH, A.; BARAZANI, O.; NEPOVIM, A.; SOUDEK, P.; SMRCEK, S.; DUFKOVA, L.; KRENKOVA, S.; YRJALA, K.; SCHRÖDER, P.; VANEK, T. Plant response to heavy metals and organic pollutants in cell culture and at whole plant level. **Journal Soils Sediments**, v. 4, p. 130-140, 2004.

GOMEZ-GALERA, S.; PELACHO, A. M.; GENE, A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 10, p. 1689-1715, 2007.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the Lichens *Cetraria-Islandica* and *Ramalina-Usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984.

GOYCOOLEA, F. M.; CARDENAS, A. Pectins from *Opuntia* spp.: A short review. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 5, p. 17-29, 2003.

GROMAN, E. V.; ENRIQUEZ, P. M.; JUNG, C.; JOSEPHSON, L. Arabinogalactan for Hepatic Drug-Delivery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 547-556, 1994.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-7, 1972.

HAUER, J.; ANDERER, F. A. Mechanism of Stimulation of Human Natural-Killer Cytotoxicity by Arabinogalactan from *Larix occidentalis*. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 36, n. 4, p. 237-244, 1993.

HOLLIS, H.; SCHEINVAR, L. **El interesante mundo de las cactáceas**. . México Fondo de Cultura Económica, 1995.

IAREMA, L. **Enxertia e propagação in vitro de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. 2008. Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

IZYDORCZYK, M. S.; CUI, S. W.; WANG, Q. Polysaccharide Gums: Structures, Functional Properties and Applications. In: CUI, S. (Ed.). **Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications**: CRC Press, 2005. cap. 6, p.262-308.

JANI, G. K.; SHAH, D. P.; PRAJAPATI, V. D.; JAIN, V. C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, p. 309-323, 2009.

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

KARDOSOVA, A.; EBRINGEROVA, 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, n. 2, p. 165-176, 2004.

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.

KJONIKSEN, A. L.; HIORTH, M.; NYSTROM, B. Association under shear flow in aqueous solutions of pectin. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 4, p. 761-770, 2005.

KRISHNAVENI, K. S.; RAO, J. V. S. A new triterpene from callus of *Pterocarpus santalinus*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 10-13, 2000.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, C. A.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 45-53, 2000.

LEVIGNE, S.; RALET, M. C.; THIBAUT, J. F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 145-153, 2002.

LIMA, C. R.; COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; DIMECH, G. S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; FRAGA, M. C. C. A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo. **Acta Farmacol Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 544-9, 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.; MANGOLIN, C. A.; COLLET, S. A. D.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, R. A. C. Potencial da Cultura de Tecidos e Células de *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) para a Obtenção de Enzimas e Processos de Biotransformação. In: MARSAIOLI, A. J. P., A. L. M. (Ed.). **Biocatálise e Biotransformação – Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Schoba, v.I, 2010. p.158 - 189.

MARHUENDA, E.; MARTIN, M. J.; DELALASTRA, C. A. Antiulcerogenic Activity of Aescine in Different Experimental-Models. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 1, p. 13-16, 1993.

MARTINS, C. F.; NICOLOSO, F. T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, 2004.

MATSUMOTO, T.; MORIGUCHI, R.; YAMADA, H. Role of Polymorphonuclear Leukocytes and Oxygen-Derived Free-Radicals in the Formation of Gastric-Lesions Induced by Hcl/Ethanol, and a Possible Mechanism of Protection by Antiulcer Polysaccharide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 535-539, 1993.

MATSUMOTO, T.; SUN, X. B.; HANAWA, T.; KODAIRA, H.; ISHII, K.; YAMADA, H. Effect of the antiulcer polysaccharide fraction from *Bupleurum falcatum* L. on the healing of gastric ulcer induced by acetic acid in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 1, p. 91-3, 2002.

MAUSETH, J. D. Water-Storing and Cavitation-Preventing Adaptations in Wood of Cacti. **Annals of Botany**, v. 72, n. 1, p. 81-89, 1993.

MELLINGER, C. G. **Caracterização estrutural de polissacarídeos de *Phyllanthus niruri* Linn.** 2002. Dissertação de mestrado Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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, n. 5, p. 715-721, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v. 15, p. 474-479, 1962.

NERD, A.; TEL-ZUR, N.; MIZRAHI, Y. Fruits of vine and columnar cact. In: NOBEL, P. S. (Ed.). **Cacti: Biology and Uses**. California, USA: University of California Press, 2002. cap. 11, p.195-205.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, 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, n. 1-2, 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.

NISHINARI, K.; TAKAHASHI, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, n. 4-5, p. 396-400, 2003.

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.

O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: DEY, D. M. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1990. p.415-441.

OKSMAN-CALDENTEY, K. M.; INZE, 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.; MACHADO, M. F. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 104, n. 2, p. 149-55, 2003.

OLIVEIRA, M. A.; REIS, E. M.; NOZAKI, J. Biokinetic parameters investigation for biological treatment of cassava meal effluents. **Water Air and Soil Pollution**, v. 126, n. 3-4, p. 307-319, 2001a.

OLIVEIRA, M. A.; REIS, E. M.; NOZAKI, J. Biological treatment of wastewater from the cassava meal industry. **Environmental Research**, v. 85, n. 2, p. 177-183, 2001b.

OLIVEIRA, M. A.; RODRIGUES, C.; DOS REIS, E. M.; NOZAKI, J. Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and *Opuntia ficus indica*. **Quimica Nova**, v. 24, n. 3, p. 307-310, 2001.

OLIVEIRA, M. R. T.; LIMA, C. A. A.; SILVA, A. Q.; REGO, F. A. O. Caracterização física e físico-química dos frutos de palma (*Opuntia monacantha*, How) e mandacará (*Cereus peruvianus*, Mill). **Agropecuária Técnica**, v. 13, p. 49-53, 1992.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. Rio de Janeiro Elsevier, 2004.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates In: DEY, P. M. e HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1997. p.205-236.

RESENDE, A. G. **Polimorfismo de DNA em plantas regeneradas in vitro e nos descendentes RF1 de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. 2006. Tese de Doutorado em Biologia Celular Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Univesidade Estadual de Maringá, Maringá.

REZANKA, T.; DEMBITSKY, V. M. Very-long-chain alkyl esters in *Cereus peruvianus* wax. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1145-1148, 1998.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. A. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 929-967, 2001.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4-6, 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, Paraiba, Brasil: Cactaceae juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 1, p. 15-21, 2002.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 2, p. 91-120, 2000.

SAENZ, C.; ESTEVEZ, A. M.; SEPULVEDA, E.; MECKLENBURG, P. Cactus pear fruit: a new source for a natural sweetener. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 52, p. 141-149, 1998.

SAENZ, C.; SEPÚLVEDA, E. Cactus-pear juices. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 4, p. 3-10, 2001.

SAENZ, C.; SEPULVEDA, E.; MATSUHIRO, B. Opuntia spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. **Journal of Arid Environments**, v. 57, n. 3, p. 275-290, 2004.

SANMUGAPRIYA, E.; VENKATARAMAN, S. Antiulcerogenic potential of *Strychnos potatorum* Linn seeds on Aspirin plus pyloric ligation-induced ulcers in experimental rats. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 360-365, 2007.

SANTAR, I.; KISS, F.; BRIESTENSKY, J. **Anti-ulcer composition comprising a polysaccharide containing glucuronic acid**. Irlanda 2000.

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, n. 4, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J., *et al* (Ed.). **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2008. p.255-276.

SAWAYA, W. N.; KHATCHADOURIAN, H. A.; SAFI, W. M.; ALMUHAMMAD, H. M. Chemical Characterization of Prickly Pear Pulp, *Opuntia ficus Indica*, and the Manufacturing of Prickly Pear Jam. **Journal of Food Technology**, v. 18, n. 2, p. 183-193, 1983.

SILVA, W. R. **Polinização e Dispersão de *Cereus peruvianus* Miller (Cactaceae) na Serra do Japi, Estado de São Paulo**. 1983. Dissertação de mestrado Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, v.2, 1983. p.97-180.

SUN, X. B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Antiulcer Activity and Mode of Action of the Polysaccharide Fraction from the Leaves of *Panax ginseng*. **Planta Medica**, v. 58, n. 5, p. 432-435, 1992a.

SUN, X. B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Purification of an Antiulcer Polysaccharide from the Leaves of *Panax ginseng*. **Planta Medica**, v. 58, n. 5, p. 445-448, 1992b.

SZELENYL, I.; THIEMER, K. Distention Ulcer as a Model for Testing of Drugs for Ulcerogenic Side-Effects. **Archives of Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 99-105, 1978.

TANAKA, L. Y.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONCALVES, J. E.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; MARQUES, M. C. A.; WERNERD, M. F. D.; BAGGIO, C. H.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 714-721, 2010.

TANAKA, L. Y. A. **Caracterização química comparativa e atividades biológicas dos polissacarídeos obtidos das partes aéreas e de cultura de calos de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. 2010. Dissertação de mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

TANIGUCHI, S.; IMAYOSHI, Y.; KOBAYASHI, E.; TAKAMATSU, Y.; ITO, H.; HATANO, 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.

TOKER, G.; MEMISOGLU, M.; TOKER, M. C.; YESILADA, E. Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7-8, p. 618-23, 2003.

TRACHTENBERG, S.; MAYER, A. M. A Stereological Analysis of the Succulent Tissue of *Opuntia ficus indica* (L) Mill .2. Ultrastructural Development of the Mucilage Cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 32, n. 130, p. 1105-1113, 1981.

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.

WALDRON, K. W.; FAULDS, C. B. Cell wall polysaccharides: composition and structure. In: J., K.;BOONS, G. J., *et al* (Ed.). **Comprehensive glycoscience: analysis of glycans/polysaccharide function all properties**. Netherlands: Elsevier, v.2, 2007. p.181-201.

WALLACE, J. L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1A, p. 19-23, 2001.

WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. A. Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico. In: BRUNTON, L. L.;CHABNER, B. A., *et al* (Ed.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, 2012. p.1310-1320.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

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

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

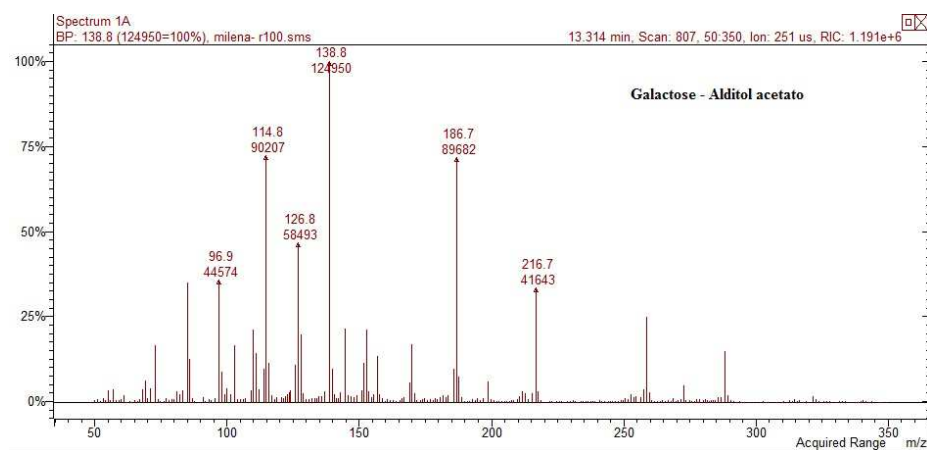
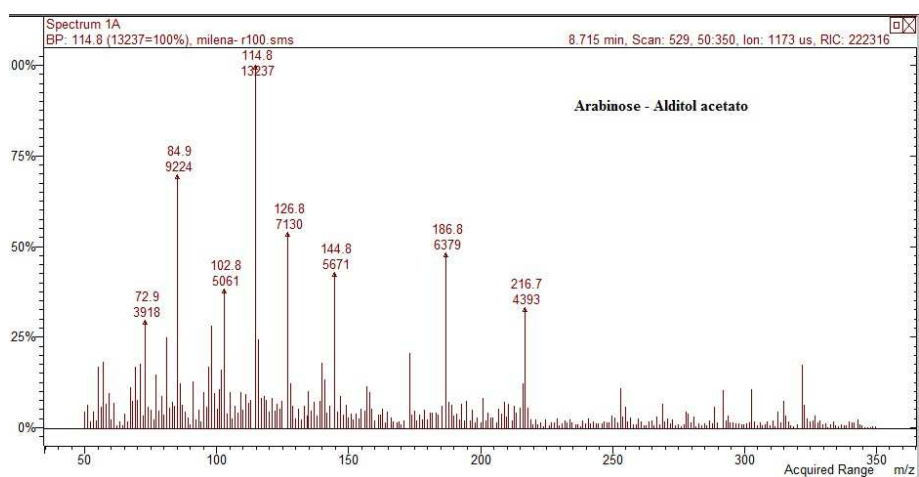
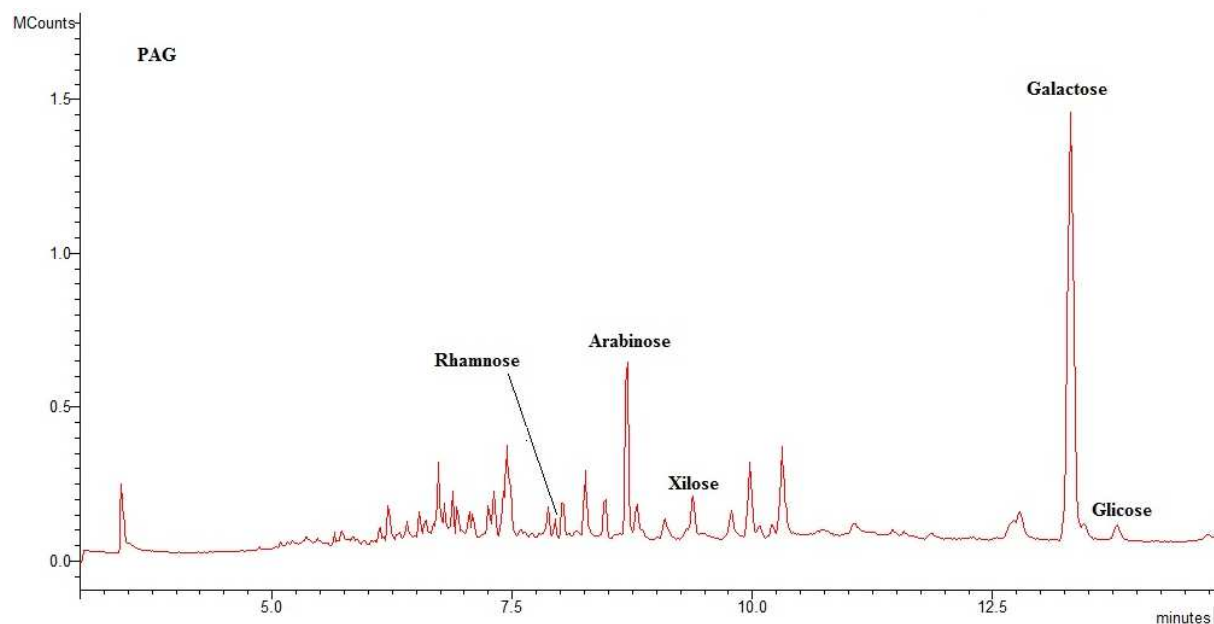
YAMADA, H. Pectic Polysaccharides from Chinese Herbs - Structure and Biological-Activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, n. 4, p. 269-276, 1994.

YAPO, B. M.; ROBERT, C.; ETIENNE, I.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1356-1364, 2007.

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, n. 8, p. 925-932, 2003.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatograma dos Alditóis Acetatos do PAG e espectros de massas da Galactose e Arabinose acetiladas.



9. ANEXOS

ANEXO A – Meio MS (MURASHIGE e SKOOG)

Macronutrientes

- Nitrato de amônio (NH_4NO_3) 1,650 mg/l= 20.6 mL/L
- Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) = 440 mg/L
- Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 370 mg/L
- Fostato de potássio (KH_2PO_4) = 170 mg/L
- Nitrato de potássio (KNO_3) = 1,900 mg/L

Micronutrientes

- Ácido bórico (H_3BO_3) = 6.2 mg/L
- Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) = 0.025 mg/L
- Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 0.025 mg/L
- Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 27.8 mg/L
- Sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) = 22.3 mg/L
- Iodeto de potássio (KI) = 0.83 mg/L
- Molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) = 0.25 mg/L
- Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) = 8.6 mg/L
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 37.2 mg/L

Aditivos

- Cinetina = 4 mg/L
- 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) = 4mg/L
- Sacarose = 30 g/L