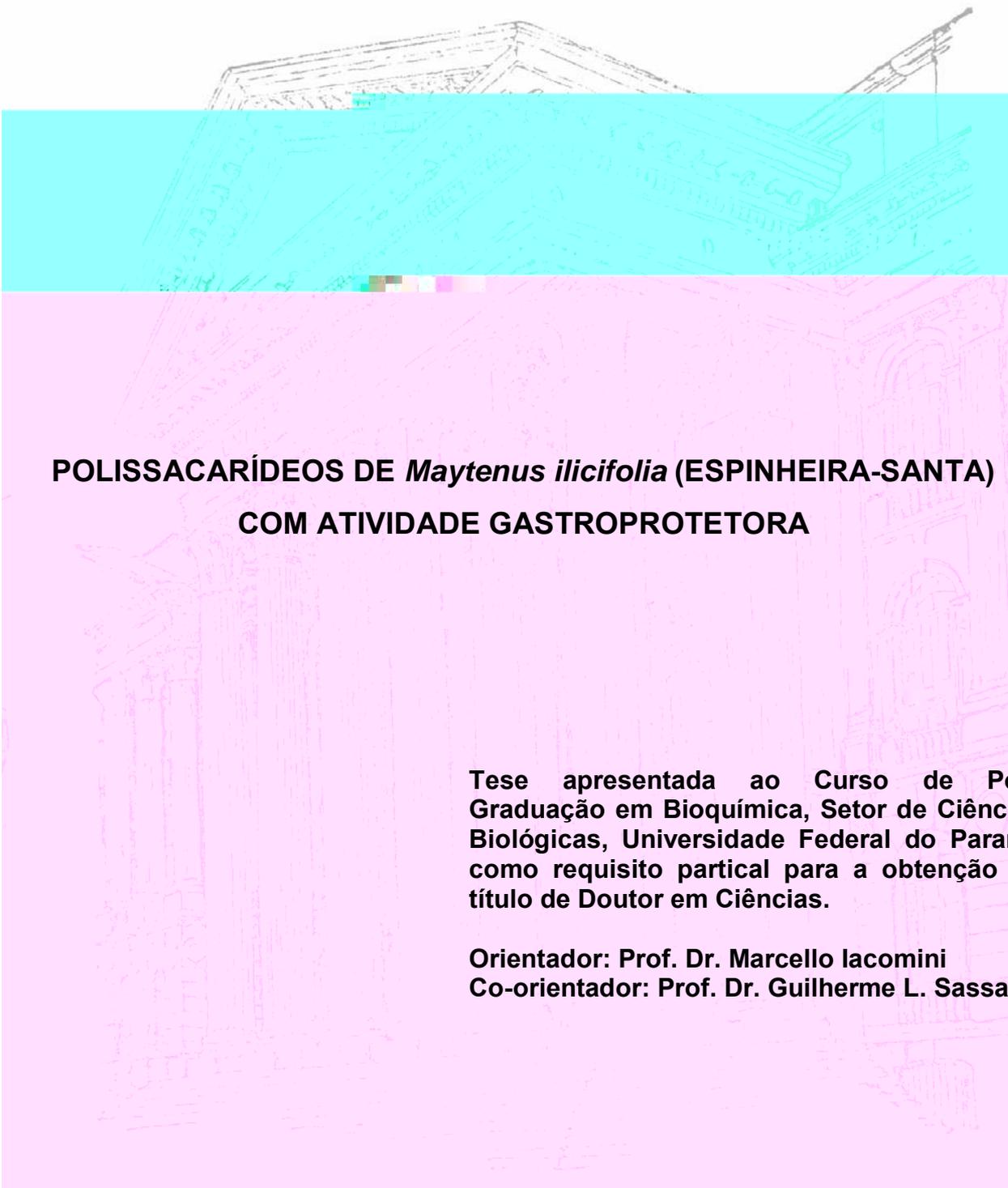


THALES RICARDO CIPRIANI



**POLISSACARÍDEOS DE *Maytenus ilicifolia* (ESPINHEIRA-SANTA)
COM ATIVIDADE GASTROPROTETORA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini
Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

**CURITIBA
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dedico este trabalho, com todo amor, aos meus pais, Luiz e Luiza, pelo esforço e dedicação em dar aos seus filhos o mais valioso dos presentes, a educação.

E, à minha esposa Patrícia, pela paciência, pelas ajudas e pelo amor.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela oportunidade, confiança e ensinamentos, os quais foram, certamente, muito além da química de carboidratos.
- Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki pelas idéias, sugestões, disposição em obter sempre o melhor espectro e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Philip A. J. Gorin, pela sempre imensa disposição em solucionar dúvidas, pelo auxílio nas correções do inglês e por seu exemplo de dedicação à pesquisa.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, em nome da Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu, pela dedicação prestada ao crescimento deste curso.
- À Profa. Dra. Maria Consuelo A. Marques, do Depto. de Farmacologia, por ter gentilmente permitido o desenvolvimento dos testes de atividade antiúlcera em seu laboratório.
- Às Doutorandas Cristiane H. Baggio e Cristina S. Freitas, do Depto. de Farmacologia, pela ajuda na realização dos testes de atividade antiúlcera.
- À Doutoranda Yanna D. Rattmann, do Depto. de Farmacologia, pela dedicação no estudo farmacológico do composto vasoativo.
- Aos amigos do laboratório: Lauro, Caroline, Ricardo, Fernanda, Fhernanda, Elaine, Andréia, Lucimara, Ana Helena, Rodrigo Vassoler e Dirce.
- Agradecimento especial ao Lauro, por manter o GC-MS sempre funcionando, pelas análises realizadas e pela amizade.

- Agradecimento especial à Caroline, pelas longas conversas e trocas de idéias envolvendo nossos fitoterápicos, pelos trabalhos em parceria e pela amizade.
- Agradecimento especial também à Elaine, pelas sugestões e pela disposição em ajudar na filtração dos polissacarídeos.
- Aos alunos de iniciação científica Maria Luisa e João Marcus pelos inúmeros auxílios.
- Aos Professores Dr. Guilherme L. Sasaki e Prof. Dr. Miguel D. Nosedá pelas análises de RMN.
- Aos colegas e amigos dos laboratórios vizinhos pelo companheirismo, pelos auxílios, pelos momentos de descontração.
- Aos Professores dos laboratórios vizinhos pelos empréstimos de livros, equipamentos e reagentes.
- À Andréia e à Rosane pelas análises de GC-MS, GLC e HPSEC-MALLS.
- À Dona Marilza por sempre ter atendido minhas muitas solicitações de declarações.
- Ao Sr. Dalnei Serighelli, da Central de Produção e Comercialização de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Paraná, pela gentileza no fornecimento do material para esta pesquisa.
- Ao Prof. Dr. Olavo Guimarães, do Depto. de Botânica, pela identificação da planta.
- Ao CNPq e Pronex-Carboidratos pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. <i>MAYTENUS ILICIFOLIA</i>	2
2.1.1. Fitoterápicos de <i>M. ilicifolia</i>	4
2.1.2. Descrição Botânica.....	5
2.2. CARBOIDRATOS DE PLANTAS.....	7
2.2.1. Parede Celular e Polissacarídeos.....	7
2.2.2. Arabinogalactanas.....	11
2.2.3. Ácidos Poligalacturônicos e Ramnogalacturonanas I.....	13
2.2.4. Xilanas.....	14
2.2.5. Polissacarídeos de <i>M. ilicifolia</i>	16
2.2.6. Atividades Biológicas de Polissacarídeos de Plantas.....	17
2.2.7. Atividade Antiúlcera de Polissacarídeos.....	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. OBJETIVO GERAL.....	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. MATERIAL DE ESTUDO.....	20
4.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	20
4.2.1. Obtenção de Polissacarídeos por Infusão.....	20
4.2.2. Obtenção de Polissacarídeos por Extração Aquosa e Alcalina Sob Refluxo.....	21
4.2.2.1. Deslipidificação e despigmentação.....	21
4.2.2.2. Extração aquosa.....	21
4.2.2.3. Extração alcalina.....	21

4.3. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	22
4.3.1. Fracionamento dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo.....	22
4.3.2. Fracionamento dos Polissacarídeos pelo Método de Fehling.....	22
4.3.3. Tratamento com α -amilase.....	22
4.3.4. Fracionamento dos Polissacarídeos por Ultrafiltração e Diálise.....	23
4.4. ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS.....	23
4.4.1. Composição Monossacarídica.....	23
4.4.2. Metilação dos Polissacarídeos e Análise na Forma de Acetatos de Alditóis.....	24
4.4.3. Degradação Controlada de Smith.....	24
4.4.4. Carboxi-Redução.....	24
4.5. TESTE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR..	25
4.5.1. Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta <i>Performance</i> com Detector de Espalhamento de Luz de Multiângulos (HPSEC-MALLS).....	25
4.6. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	26
4.6.1. Método Cromatográfico.....	26
4.6.1.1. Cromatografia Líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).....	26
4.6.2. Método Espectroscópico.....	27
4.6.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	27
4.6.3. Métodos Espectrofotométricos.....	27
4.6.3.1. Dosagem de ácidos urônicos.....	27
4.6.3.2. Dosagem de proteínas totais.....	27
4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA ANTIÚLCERA GÁSTRICA.....	28
4.7.1. Animais.....	28
4.7.2. Indução de Lesão Gástrica Aguda em Ratos.....	29
4.7.3. Análise Estatística.....	29
4.8. OBTENÇÃO DO COMPOSTO VASOATIVO.....	29
4.8.1. Extração com Clorofórmio-Metanol.....	29
4.8.2. Extração com Metanol-Água.....	30
4.8.3. Extração Aquosa.....	30
4.9. PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DO COMPOSTO VASOATIVO.....	30

4.9.1. Determinação do Efeito Vasorrelaxante.....	30
4.9.2. Partição Líquido/Líquido de ES.....	31
4.9.3. Fracionamento da Fração Acetato de Etila.....	31
4.9.4. Análise do Composto Vasoativo (RMN- ¹³ C e GC-MS).....	31
4.9.5. Quantificação de Catequina e Epicatequina Presentes em ES por HPLC..	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
5.1. POLISSACARÍDEO DO INFUSO.....	33
5.1.1. Extração e Purificação.....	33
5.1.2. Caracterização Estrutural de AG.....	39
5.1.2.1. Caracterização estrutural de AG: carboxi-redução.....	41
5.1.2.2. Caracterização estrutural de AG: degradação controlada de Smith.....	41
5.1.2.3. Caracterização estrutural de AG: discussão final.....	44
5.2. POLISSACARÍDEO DA EXTRAÇÃO AQUOSA SOB REFLUXO.....	46
5.2.1. Extração e Purificação.....	46
5.2.2. Caracterização Estrutural de PGA.....	49
5.3. POLISSACARÍDEO DA EXTRAÇÃO ALCALINA.....	51
5.3.1. Extração e Purificação.....	51
5.3.2. Caracterização Estrutural de HX.....	53
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCERA GÁSTRICA DE AG, PGA E HX.....	57
5.4.1. Atividade Antiúlcera de Polissacarídeos Semelhantes à AG, PGA e HX.....	60
5.5. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO VASOATIVO.....	62
5.5.1. Avaliação Estrutural do Composto Vasoativo.....	65
5.5.2. Quantificação de Catequina na Fração ES.....	66
6. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	<i>Maytenus ilicifolia</i> (folhas e frutos).....	6
FIGURA 2 -	Modelo da parede celular (ALBERSHEIM, 1975).....	10
FIGURA 3 -	Modelo de parede celular primária tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).....	10
FIGURA 4 -	Estrutura das arabinogalactanas tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).....	11
FIGURA 5 -	Estrutura das arabinogalactanas tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993).....	12
FIGURA 6 -	Principais cadeias laterais substituintes das xilanas (JOSELEAU et al., 1992).....	15
FIGURA 7 -	Esquema da estrutura da arabinogalactana tipo I (AG), ligada a uma ramnogalacturonana tipo I (RGI), obtida das folhas de <i>M. ilicifolia</i> por extração alcalina 2% (CIPRIANI et al., 2004)....	16
FIGURA 8 -	Esquema da estrutura da xilana obtida das folhas de <i>M. ilicifolia</i> por extração alcalina 10% (CIPRIANI, 2003).....	16
FIGURA 9 -	Fluxograma do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos pela infusão das folhas de <i>M. ilicifolia</i>	34
FIGURA 10 -	Perfis de eluição em HPSEC, utilizando detector de índice de refração (RID), das frações SobFeh, 300R, 30R, AG e 16D, obtidas pelos processos de purificação dos polissacarídeos extraídos pela infusão das folhas de <i>M. ilicifolia</i> . Valores de dn/dc e M_w são mostrados para o polissacarídeo homogêneo AG.....	35
FIGURA 11 -	Espectros de RMN- ¹³ C das frações 300R, 30R e AG, obtidas pelos processos de purificação dos polissacarídeos extraídos pela infusão das folhas de <i>M. ilicifolia</i> . Experimentos realizados em D ₂ O, a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	38

FIGURA 12 -	Espectros de RMN- ¹³ C da arabinogalactana AG (A) e dos polissacarídeos obtidos após um (AG-OR; B) e dois (AG-OR2; C) processos de degradação controlada de Smith realizados sobre AG. Experimentos realizados em D ₂ O (A) ou Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ (B e C), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. DEPT de AG-OR (inserto em B).....	40
FIGURA 13 -	Esquema das estruturas sugeridas para AG (A), RGI (B), AG-OR (C) e AG-OR2 (D). Em negrito são mostrados os monossacarídeos neutros obtidos após a carboxi-redução de AG.....	45
FIGURA 14 -	Fluxograma do processo de extração e purificação do polissacarídeo PGA obtido das folhas de <i>M. ilicifolia</i> por extração aquosa sob refluxo.....	47
FIGURA 15 -	Perfil de eluição do componente precipitado da precipitação de Fehling (PGA) em HPSEC.....	48
FIGURA 16 -	Espectro de RMN- ¹³ C do polissacarídeo PGA. Experimento realizado em D ₂ O, a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	49
FIGURA 17 -	Estrutura do polissacarídeo PGA, mostrando as unidades de α-D-GalpA ligadas por 1→4.....	50
FIGURA 18 -	Fluxograma do processo de extração e purificação do polissacarídeo HX, obtido das folhas de <i>M. ilicifolia</i> por extração alcalina sob refluxo.....	52
FIGURA 19 -	Perfil de eluição do polissacarídeo HX em HPSEC.....	53
FIGURA 20 -	Espectro de RMN- ¹³ C do polissacarídeo HX. Experimento realizado em D ₂ O, a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm	56
FIGURA 21 -	Estrutura proposta do polissacarídeo HX, mostrando a cadeia principal de unidades de β-D-Xylp ligadas por 1→4 e os terminais não redutores de 4-O-Me-GlcpA e Galp.....	56
FIGURA 22 -	Efeito protetor de AG (3, 10 e 30 mg/kg, <i>p.o.</i>), PGA (1, 10 e 100 mg/kg, <i>p.o.</i>) e HX (10, 30, e 100 mg/kg, <i>p.o.</i>) contra lesões gástricas induzidas por EtOH (CL: controle, H ₂ O 0,1 ml/100 g, <i>p.o.</i> e OM: omeprazol 40 mg/kg, <i>p.o.</i>). Os resultados são expressos como média ± erro médio padrão (n = 6). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. * <i>p</i> < 0,05 quando comparado ao grupo controle.....	59

FIGURA 23 -	Efeito protetor de AG (10, and 30 mg/kg, <i>p.o.</i>), contra lesões gástricas induzidas por EtOH (CL: controle, H ₂ O 0,1 ml/100 g, <i>p.o.</i> and OM: omeprazol 40 mg/kg, <i>p.o.</i>).....	60
FIGURA 24 -	Fluxograma do processo de extração e fracionamento de ES, fração que teve a atividade vasorrelaxante investigada por RATTMANN (2004).....	63
FIGURA 25 -	Avaliação do efeito vasorrelaxante sobre anéis de aorta de ratos, previamente contraídos por incubação com fenilefrina (1 μ M). (A) Atividade relaxante de ES (150, 200 e 300 μ g/ml). Acetilcolina (ACh; 1 μ M) é usada como controle positivo; (B) Atividade relaxante das frações F_{H_2O} (círculos pintados), F_{EtOAc} (quadrados), F_{SOL} (triângulos) e F_{INS} (círculos) nas concentrações de 3, 5, 10, 30, 50 e 100 μ g/ml. Os resultados mostram a média \pm erro médio padrão (n = 6). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste- <i>t</i> sujeito à correção de Bonferroni. * <i>p</i> < 0,05 quando comparado ao máximo de contração induzida por fenilefrina (1 μ M).....	64
FIGURA 26 -	Espectro de RMN- ¹³ C da fração F_{INS} , obtida após fracionamento de ES. Experimento realizado em Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ , a 40 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	65
FIGURA 27 -	Estruturas químicas da catequina e epicatequina.....	66
FIGURA 28 -	Análise de GC-MS da fração ES trimetilsililada (TMS). Espectro de massa da catequina-TMS e epicatequina-TMS é mostrado.....	67
FIGURA 29 -	Perfil de eluição da fração ES em HPLC com detecção em 280 nm. (1) (+)-catequina; (2) (-)-epicatequina.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO INFUSO DAS FOLHAS DE <i>Maytenus ilicifolia</i>	37
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE AG, AG-CR, AG-OR E AG-OR2.....	43
TABELA 3 -	PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE AG, AG-CR, AG-OR E AG-OR2.....	43
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA SOB REFLUXO DAS FOLHAS DE <i>Maytenus ilicifolia</i>	48
TABELA 5 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS EXTRATOS ALCALINOS E DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO COM KOH 10% DAS FOLHAS DE <i>Maytenus ilicifolia</i>	52
TABELA 6 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO POLISSACARÍDEO HX E DO POLISSACARÍDEO HX CARBOXI-REDUZIDO (HX-CR).....	54
TABELA 7 -	PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO HX E DO POLISSACARÍDEO HX CARBOXI-REDUZIDO (HX-CR).....	55
TABELA 8 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C (PPM) PARA EPICATEQUINA EM $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$	66

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
300R	Material retido na ultrafiltração em membrana de 300 kDa
30R	Material retido na ultrafiltração em membrana de 30 kDa
16D	Material dialisável em membrana de 16 kDa
AG	Arabinogalactana purificada, não-dialisável em membrana de 16 kDa, obtida pela infusão das folhas de <i>M. ilicifolia</i>
AG-CR	Arabinogalactana carboxi-reduzida
AG-OR	Polissacarídeo obtido após um processo de degradação controlada de Smith realizado sobre AG
AG-OR2	Polissacarídeo obtido após dois processos de degradação controlada de Smith realizados sobre AG
Ara	Arabinose
BaCO ₃	Carbonato de bário
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
CH ₃ I	Iodeto de metila
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DE ₅₀	Dose efetiva 50%
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
dn/dc	Taxa de variação do índice de refração com relação à concentração
D ₂ O	Água deuterada
ES	Fração avaliada quanto à atividade vasorrelaxante, correspondente ao sobrenadante etanólico obtido pelo tratamento do extrato aquoso, das folhas de <i>M. ilicifolia</i> , com 3 volumes de etanol
EtOH	Etanol
F _{H₂O}	Fração solúvel em água obtida pela partição de ES entre água e acetato de etila
F _{EtOAc}	Fração solúvel em acetato de etila obtida pela partição de ES entre água e acetato de etila

F_{SOL}	Fração correspondente ao material solúvel obtido pela tentativa de solubilização de F_{EtOAc} em pequeno volume de acetato de etila
F_{INS}	Fração correspondente ao material insolúvel obtido pela tentativa de solubilização de F_{EtOAc} em pequeno volume de acetato de etila
Gal	Galactose
GalA	Ácido galacturônico
Glc	Glucose
HPSEC	Cromatografia de exclusão estérica de alta <i>performance</i>
HX	Polissacarídeo purificado, correspondente ao componente precipitado da precipitação de Fehling, obtido das folhas de <i>M. ilicifolia</i> por extração alcalina a 10%, sob refluxo
HX-CR	Polissacarídeo HX carboxi-reduzido
Man	Manose
Me	Grupamento metil (-CH ₃)
Me ₂ SO	Dimetilsulfóxido
Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
NaBH ₄	Boroidreto de sódio
NaBD ₄	Boroidreto de sódio deuterado
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaIO ₄	Periodato de sódio
NaN ₃	Azida de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
PGA	Polissacarídeo purificado, correspondente ao componente precipitado da precipitação de Fehling, obtido das folhas de <i>M. ilicifolia</i> por extração aquosa sob refluxo
RGI	Ramnogalacturonana I
Rha	Ramnose
SobFeh	Componente sobrenadante da precipitação de Fehling
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
Xyl	Xilose

RESUMO

Maytenus ilicifolia é uma planta medicinal conhecida como “espineira-santa”, encontrada no Paraguai, Uruguai, Argentina e Sul do Brasil. Suas folhas são muito usadas para o preparo de chás por infusão ou fitoterápicos para o tratamento de úlceras gástricas. Polissacarídeos que apresentam atividade antiúlcera foram obtidos de diversas plantas. Para determinar se polissacarídeos poderiam colaborar para a propriedade antiúlcera da *M. ilicifolia*, estes foram isolados, caracterizados e tiveram a atividade antiúlcera avaliada. O processo de infusão das folhas forneceu um polissacarídeo principal, após várias etapas de purificação (processo de congelamento e degelo, precipitação de Fehling, ultrafiltração e diálise), constituído por Ara:Gal:GalA:4-O-Me-GlcA:Rha:Glc numa proporção molar de 42:41:6:5:4:2. Análise de metilação, degradação controlada de Smith e espectroscopia de RMN-¹³C indicaram que o polissacarídeo era uma arabinogalactana tipo II (AG), contendo uma cadeia principal formada por unidades de β-D-Galp (1→3)-ligadas, substituídas em O-6 por cadeias laterais de β-D-Galp (1→6)-ligadas, as quais foram principalmente substituídas em O-3 por cadeias de α-L-Araf (1→5)- e (1→3)-ligadas, e terminais não redutores de α-L-Araf e 4-O-Me-GlcpA. Extrações aquosa e alcalina a 10%, sob refluxo, forneceram um ácido poligalacturônico (PGA) e uma heteroxilana (HX), respectivamente, após purificação pelos processos de congelamento e degelo e precipitação de Fehling. Análise de metilação e espectroscopia de RMN-¹³C revelaram a estrutura dos dois polissacarídeos isolados. O ácido poligalacturônico continha apenas unidades de α-D-GalAp 4-O-substituídas e a heteroxilana continha Xyl:Gal:Glc:4-O-Me-GlcA numa proporção molar de 76:5:10:9, com uma cadeia principal formada por unidades de β-D-Xylp 4-O-substituídas. Todos os polissacarídeos isolados de *M. ilicifolia* inibiram significativamente lesões gástricas induzidas por etanol em ratos, com valores de DE₅₀ de 9,3 mg/kg (AG), 103 mg/kg (PGA) e 40 mg/kg (HX). Estes resultados mostram que polissacarídeos de diferentes estruturas apresentam atividades antiúlcera distintas, indicando que esta atividade é influenciada pela estrutura química e talvez física do polissacarídeo. Eles mostram ainda que o polissacarídeo AG, obtido pelo processo de infusão, pode ter um importante papel no efeito

antiúlcera do chá de *M. ilicifolia*. Além disso, foi investigado qual composto presente no sobrenadante etanólico (ES) do extrato aquoso das folhas de *M. ilicifolia* poderia ser o responsável pela propriedade vasorrelaxante previamente descrita. Partição de ES entre H₂O e EtOAc forneceu uma fração várias vezes mais potente. Sua análise de RMN-¹³C mostrou sinais típicos de catequina, sugerindo que algum composto relacionado à catequina poderia estar envolvido com a atividade vasorrelaxante da *M. ilicifolia*.

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia is a medicinal plant known as “espinheira-santa” and is found in Paraguay, Uruguay, Argentina, and Southern Brazil. Its leaves are widely used as a tea (infusion) or in industrial medicines for effective treatment of stomach ulcers. Anti-ulcer polysaccharides have been obtained from several plants. Thus, in order to determine if polysaccharides could collaborate for the anti-ulcer property of *M. ilicifolia*, they were isolated, characterized, and their anti-ulcer effect was assayed. The infusion gave a main polysaccharide after several purification steps, consisting of freezing-thawing process, Fehling precipitation, ultrafiltration, and dialysis. It consisted of Ara:Gal:GalA:4-O-Me-GlcA:Rha:Glc in a 42:41:6:5:4:2 molar ratio. Methylation analysis, controlled Smith degradation, and ^{13}C NMR spectroscopy indicated that it was a type II arabinogalactan (AG) containing a (1→3)-linked β -D-Galp main chain, substituted at O-6 by (1→6)-linked β -D-Galp chains, which were mainly substituted at O-3 by (1→

fraction several times more potent. Its ^{13}C NMR analysis showed typical signals of catechin, suggesting that a catechin derivative could be involved in the vasorelaxant activity of *M. ilicifolia*.

1. INTRODUÇÃO

A *Maytenus ilicifolia* é uma planta medicinal conhecida popularmente como “espinheira-santa”. Suas folhas são utilizadas para o preparo de infusões empregadas para o tratamento de gastrite e úlcera gástrica. Esta propriedade biológica da planta foi comprovada cientificamente por SOUZA-FORMIGONI et al. (1991). Atualmente, a *M. ilicifolia* está enquadrada entre as plantas medicinais aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fazendo parte de um pequeno grupo de 34 plantas isentas da necessidade de testes de eficácia e de toxicidade para o registro e comercialização como fitoterápicos (BRASIL, 2004).

Diversos metabólitos secundários da *M. ilicifolia* já foram quimicamente caracterizados, entre eles triterpenos, sesquiterpenos, catequina, epicatequina, flavonóides e glucosídeos. No entanto, quando uma infusão das folhas da planta é consumida, não apenas metabólitos secundários, mas também metabólitos primários são ingeridos e entre estes últimos estão os polissacarídeos.

Muitas plantas utilizadas na medicina popular já foram descritas contendo polissacarídeos biologicamente ativos, incluindo atividade antiviral, antitumoral, imunoestimulante, antiinflamatória, anticomplemento, anticoagulante, hipoglicemiante e, até mesmo, atividade antiúlcera gástrica (SRIVASTAVA e KULSHVESHITA, 1989; CAPEK et al., 2003; YAMADA, 1994; NERGARD et al., 2005).

Sabendo que polissacarídeos são capazes de apresentar propriedade antiúlcera gástrica, este trabalho tem como enfoque principal avaliar se os polissacarídeos obtidos a partir das folhas de *M. ilicifolia* apresentam esta atividade, incluindo nesta avaliação o principal polissacarídeo obtido pelo processo de infusão das folhas desta planta.

Outra propriedade descrita para esta planta medicinal é a ação vasorrelaxante, proporcionada por uma fração solúvel em etanol, derivada de um extrato aquoso das folhas. Esta atividade foi descrita por RATTMANN (2004). Em paralelo ao estudo dos polissacarídeos, será descrito o processo de purificação parcial do composto vasorrelaxante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *MAYTENUS ILICIFOLIA*

Esta planta é conhecida popularmente, principalmente, como espinheira-santa, mas também como cancerosa, coromilho do campo, sombra de touro, espinheira-divina e salva-vidas (CARLINI e BRAZ, 1988). Ela é largamente encontrada no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (ZHU et al., 1998). Na medicina popular, o infuso das suas folhas é usado como anticoncepcional, diurético, analgésico, anti-séptico, regularizador das funções hepáticas, antibiótico e antineoplásico. Externamente, é utilizado com sucesso em acnes e alguns tipos de eczemas, feridas e ulcerações (UEMG, 2001). Há relatos de que, desde 1922, a espinheira-santa é empregada com resultado positivo contra ulcerações do estômago (CARLINI e BRAZ, 1988; GEOCZE et al., 1988).

Em 1988, no Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde, foi publicada uma série de seis trabalhos relatando as propriedades terapêuticas da *M. ilicifolia*, em relação a sua ação antiúlcera gástrica (CARLINI, 1988). Os resultados obtidos comprovaram cientificamente a eficácia terapêutica da planta.

MACAUBAS et al. (1988), estudando plantas utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de males do estômago, demonstraram que o infuso das folhas de *M. ilicifolia* apresenta um marcante efeito protetor contra úlcera gástrica induzida em ratos por indometacina, reserpina e estresse provocado por imobilização em baixa temperatura. Ambas, *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* apresentam tal ação (CARLINI e BRAZ, 1988). Foi verificado que tanto a administração oral aguda quanto o uso prolongado do infuso liofilizado, ressuspendido em água, mesmo em doses centenas de vezes maiores do que as ingeridas pelo homem, são completamente atóxicas a ratos e camundongos (OLIVEIRA e CARLINI, 1988; CARLINI et al., 1988; OLIVEIRA et al., 1991). Além disso, doses correspondendo ao dobro da posologia utilizada comumente na medicina popular (uso popular do infuso = 3 g de planta moída + 150 ml de água fervente) não mostraram toxicidade para o ser humano (CARLINI e FROCHTENGARTEN, 1988). GEOCZE et al. (1988)

demonstraram a eficácia do infuso liofilizado de *M. ilicifolia* (200 mg) no tratamento da dispepsia não-ulcerosa (síndrome caracterizada por sintomas semelhantes aos da úlcera péptica, mas sem achado endoscópico de lesão ulcerativa ou de refluxo gastro-esofágico). No entanto, em pacientes ulcerosos não foram obtidos resultados concludentes.

Parte desse estudo da ação antiúlcera gástrica da espinheira-santa foi publicado por SOUZA-FORMIGONI et al. (1991). Os extratos aquosos quentes (infusos) da *M. ilicifolia* e da *M. aquifolium* causaram um aumento do volume e do pH do suco gástrico de ratos, com efeitos sobre o pH comparáveis aos da cimetidina. A cimetidina é um antagonista de receptor H_2 que inibe competitivamente a secreção gástrica provocada pela histamina e por outros agonistas de receptores H_2 (GOODMAN e GILMAN, 1996). O efeito protetor dependente da dose foi demonstrado tanto com a administração via oral quanto intraperitoneal, o que indica um possível mecanismo de ação sistêmico. Os resultados obtidos tendem a confirmar o uso popular da planta. SOUZA-FORMIGONI et al. (1991) também mencionam que extratos liofilizados mostram a mesma atividade antiulcerogênica depois de até 15 meses de estocagem. Dessa forma, os extratos liofilizados apresentam grande estabilidade, o que dá valor ao uso de produtos comerciais da planta.

EZAKI et al. (1985), citados por SOUZA-FORMIGONI et al. (1991), demonstraram que a atividade antiulcerogênica da planta *Linderae umbellatae* deve-se à presença de taninos condensados. No entanto, SOUZA-FORMIGONI et al. (1991) encontraram apenas 0,2% de taninos entre o total de 19,4% de compostos fenólicos em *Maytenus* e nenhum tanino condensado foi identificado.

FALEIROS et al. (1992) verificaram que frações hexânicas brutas de folhas de *M. ilicifolia*, ricas em hidrocarbonetos e triterpenos, apresentam efeito antiulcerogênico semelhante ao da cimetidina em ratos. Duas substâncias isoladas a partir do extrato aquoso de folhas de *M. ilicifolia*, a 4-O-metil-epigallocatequina e seu epímero 4-O-metil-ent-galocatequina, inibiram a secreção ácida de forma dependente da dose em mucosas gástricas de rãs (OLIVEIRA et al., 1992).

FERREIRA et al. (2004), em estudo com mucosa gástrica isolada de rãs, sugeriram que o infuso das folhas de *M. ilicifolia* reduz a secreção ácida pelo antagonismo dos receptores H_2 . JORGE et al. (2004) verificaram efeito

antiinflamatório e antiulcerogênico de extratos de folhas *M. ilicifolia* obtidos com hexano e acetato de etila. A análise fitoquímica desses extratos revelou a presença de esteróides e triterpenos na fração hexânica, e taninos condensados e flavonóides na fração acetato de etila.

Outros estudos com a planta mostraram que alguns triterpenos provenientes do extrato metanólico das cascas das raízes e folhas apresentam efeitos citotóxicos em culturas de células (ITOKAWA et al., 1991; SHIROTA et al., 1994; OHSAKI et al., 2004). RATTMANN (2004) verificou efeito vasorrelaxante de uma fração solúvel em etanol obtida de um extrato aquoso, sob refluxo, das folhas de *M. ilicifolia*. Esse efeito também foi verificado para o extrato obtido por simples infusão das folhas. VELLOSA et al. (2006) verificaram atividade antioxidante de um extrato etanólico obtido das cascas das raízes da planta. Esse efeito foi relacionado à provável ação de polifenóis e flavonóides sobre o seqüestro de radicais livres. Além disso, foram caracterizados glucosídeos, denominados ilicifolinosídeos A, B e C, do extrato etanólico a 70%, em temperatura ambiente, das folhas (ZHU et al., 1998) e flavonóides glicosilados a partir do infuso (LEITE et al., 2001).

2.1.1. Fitoterápicos de *M. ilicifolia*

A *M. ilicifolia* faz parte de uma lista de 34 plantas (BRASIL, 2004) que não necessitam de validação das indicações terapêuticas e da segurança de uso para o registro, como medicamentos fitoterápicos, no Ministério da Saúde. Para o registro basta respeitar as seguintes especificações determinadas para a planta: parte usada, padronização (marcador químico para o extrato), forma de uso, indicação terapêutica, dosagem, via de administração, posologia e restrição de uso. No caso da *M. ilicifolia*, as especificações são:

- Parte usada: folhas;
- Padronização (marcador químico): taninos totais;
- Formas de uso: extratos e tintura;
- Indicações terapêuticas: dispepsias, coadjuvante no tratamento de úlcera gástrica;
- Dose diária: 60 a 90 mg de taninos/dia;
- Via de administração: oral;

- Restrição de uso: não apresenta (venda sem prescrição médica).

Como citado acima, as dosagens dos fitoterápicos de *M. ilicifolia* são padronizadas de acordo com o conteúdo de taninos totais presente. Os taninos são classicamente conhecidos pela sua atuação no processo de cicatrização. Eles provocam a precipitação das proteínas dos tecidos lesados, formando um revestimento protetor que favorece a sua regeneração (HEIJMEN et al., 1997; PANIZZA et al., 1998). Dessa forma, os taninos poderiam atuar no processo de cura de úlceras gástricas, justificando o uso terapêutico da *M. ilicifolia*. Apesar disso, não existem trabalhos correlacionando os efeitos terapêuticos da *M. ilicifolia* com o seu conteúdo de taninos. Além disso, SOUZA-FORMIGONI et al. (1991) verificaram que no infuso das folhas da planta apenas 0,2% de taninos estão presentes, fortemente sugerindo que outros compostos obtidos pela infusão possam colaborar para o seu efeito antiúlcera.

2.1.2. Descrição Botânica

Segundo CARVALHO-OKANO (1992), o gênero *Maytenus* é constituído por 225 espécies e está representado, no Brasil, por 77 espécies e 14 variedades, incluindo representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos. *M. ilicifolia* está enquadrada na seção *Oxyphylla*, cuja característica é a presença de espinhos no bordo foliar. É um subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo até cinco metros de altura. Os ramos novos são glabros, angulosos, tetra ou multicarenados. As folhas são coriáceas e glabras, as estípulas, inconspícuas, o pecíolo tem de 2 a 5 mm de comprimento, o limbo, de 22 a 89 mm de comprimento e de 11 a 30 mm de largura e as nervuras são proeminentes na face abaxial. A forma das folhas varia de elíptica a estreitamente elíptica, com base aguda a obtusa e ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado; as folhas podem ter a margem inteira ou com espinhos, em número variável, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos.

M. ilicifolia é facilmente distinguível das demais espécies da seção, pelos ramos angulosos tetra ou multicarenados e frutos orbiculares de coloração

vermelho-alaranjada. Contudo, é freqüentemente confundida com *M. aquifolium*, espécie-tipo da seção, cujo nome comum também é espinheira-santa.

Algumas das características descritas anteriormente podem ser verificadas na Figura 1.



FIGURA 1 – *Maytenus ilicifolia* (folhas e frutos).

2.2. CARBOIDRATOS DE PLANTAS

Nas plantas, os carboidratos existem como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, tais como: glicosídeos cianogênicos e fenólicos, flavonóides glicosilados e glicoproteínas (AVIGAD e DEY, 1997). Depois da água, eles são os principais constituintes químicos da maioria dos tecidos e células das plantas, isto porque formam a parede celular, que é o suporte estrutural para as células vegetais, entre outras estruturas. Conseqüentemente, os carboidratos estruturais das plantas formam a mais abundante reserva de compostos naturais disponível na Terra e são certamente nosso mais importante recurso natural renovável (REID, 1997).

2.2.1. Parede Celular e Polissacarídeos

Com muito poucas exceções, as células das plantas são envolvidas pela parede celular (REID, 1997). Ela confere resistência e forma para a célula, rigidez para a planta toda, controla o crescimento celular, participa na comunicação célula-célula e protege a célula contra o ataque de patógenos e predadores (BRETT e WALDRON, 1990).

As paredes de células adjacentes encontram-se numa linha divisória conhecida como lamela média, que confere uma forte aderência célula-célula. As células jovens, que ainda mantêm a capacidade de divisão e alongamento, apresentam uma parede celular muito fina, com 0,1 a 1 μm de espessura, chamada parede celular primária. Eventos metabólicos na parede primária são de fundamental importância no processo de expansão celular (REID, 1997).

Quando as células da planta perdem a capacidade de crescimento e divisão, elas podem se diferenciar para células de vários tipos, algumas das quais têm paredes celulares muito espessas. O espessamento é feito pelo depósito da parede secundária entre a parede celular primária e a membrana plasmática da célula. Células com espessamento de parede secundária são muito importantes para conferir rigidez aos tecidos da planta (REID, 1997).

Depois do completo espessamento secundário ocorre a deposição, por toda a parede celular, do polímero fenólico lignina, que confere dureza à planta. Esse processo, chamado de lignificação, é usualmente seguido pela morte celular e pelo desaparecimento do conteúdo citoplasmático (REID, 1997).

A parede celular das plantas é altamente organizada, apresentando muitos polissacarídeos diferentes, proteínas e substâncias aromáticas. Destes, os polissacarídeos são os principais componentes da parede celular e de suas armações estruturais, e são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA e McCANN, 2000). A composição da parede celular primária das dicotiledôneas é, tipicamente, 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% material péctico e 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos. Já a parede celular secundária, muito mais espessa que a parede primária, consiste de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e quantidade negligenciável de pectina (DEY et al., 1997).

As pectinas são, normalmente, extraídas com soluções aquosas contendo substâncias como oxalato de amônio ou EDTA. Estas substâncias facilitam a extração desses polímeros, pois quelam o Ca^{2+} mr carbo(ex)24.77(l)9.3(i)-11.5(c)5.7.

i g c t a 6 2 2 . a c t u d á r 5 . 7 i f o a (P G A)

glucuronomananas, xiloglucanas, calose (β -glucanas com ligações 1 \rightarrow 3), β -glucanas 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4 ligadas e arabinogalactanas tipo II (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990). Este último tipo de polissacarídeo também pode estar presente em frações pécticas, associado a moléculas de RGI (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

O grupo de PETER ALBERSHEIM foi o primeiro a propor um modelo para a parede celular primária das plantas, a partir de estudos das interconexões dos componentes macromoleculares, pectinas, hemiceluloses, celulose e proteínas, de culturas de células em suspensão de *Acer pseudoplatanus* (TALMADGE et al., 1973; BAUER et al., 1973; KEEGSTRA et al., 1973).

ALBERSHEIM (1975) descreveu a parede celular das plantas (Figura 2) como sendo composta por fibras de celulose ligadas por três outros polissacarídeos. Muitas moléculas de xiloglucana estariam aderidas à superfície das fibras de celulose por interações do tipo pontes de hidrogênio. Cada molécula de xiloglucana seria ligada a uma cadeia de arabinogalactana, que por sua vez está ligada a uma molécula de ramnogalacturonana. Cada ramnogalacturonana poderia ligar-se a várias arabinogalactanas vindas da mesma ou de outra fibra de celulose. Desse modo, cada fibra de celulose poderia ser conectada por várias cadeias de ramnogalacturonanas. Além disso, glicoproteínas também estariam presentes, ligadas, por meio de suas unidades de açúcar, às moléculas de ramnogalacturonanas.

Mais recentemente, CARPITA e GIBEAUT (1993) propuseram dois modelos distintos de parede celular primária para angiospermas. As dicotiledôneas e monocotiledôneas, com exceção das gramíneas, apresentam paredes ricas em pectina e hemicelulose, denominadas paredes tipo I. As paredes primárias das gramíneas, chamadas tipo II, contêm muito pouca pectina e proporcionalmente mais hemicelulose. Na parede celular primária tipo I (Figura 3), microfibrilas de celulose estão entrelaçadas por xiloglucanas e esta estrutura está embutida numa matriz de polissacarídeos pécticos, ácido poligalacturônico e ramnogalacturonana, este último substituído com pequenos grupos laterais de arabinana, galactana e arabinogalactana. Na parede tipo II, as microfibrilas de celulose são entrelaçadas por glucuronoarabinoxilanas e apenas uma pequena quantidade de pectina está presente.

2.2.2. Arabinogalactanas

Arabinogalactanas são polímeros complexos, de difícil caracterização (WHISTLER, 1970; ASPINAL, 1982), presentes na maioria das plantas superiores (FINCHER et al., 1983). Elas são encontradas nas mais diversas estruturas vegetais, tendo sido já isoladas a partir de folhas, caules, raízes, flores, sementes, gomas e exsudatos vegetais (FINCHER et al., 1983; MENESTRINA, et al., 1998; DELGOBO et al., 1998; DELGOBO et al., 1999; CIPRIANI et al. 2004; MELLINGER et al., 2005b).

ASPINAL (1973) classificou as arabinogalactanas de plantas superiores em dois grandes grupos ao constatar diferenças nas ligações químicas envolvidas na formação da cadeia principal destas macromoléculas. As que apresentavam cadeia principal de (1→4)β-D-galactanas foram denominadas de arabinogalactanas tipo I enquanto as que tinham cadeia principal formada por (1→3) e (1→6)β-D-galactanas foram classificadas como arabinogalactanas tipo II.

As arabinogalactanas tipo I (Figura 4), compostas por cadeias de (1→4)β-D-galactanas, são encontradas somente em frações péciticas, geralmente associadas às ramnogalacturonanas I. Elas apresentam, na maioria das vezes, unidades de arabinose ligadas no O-3 das galactoses (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

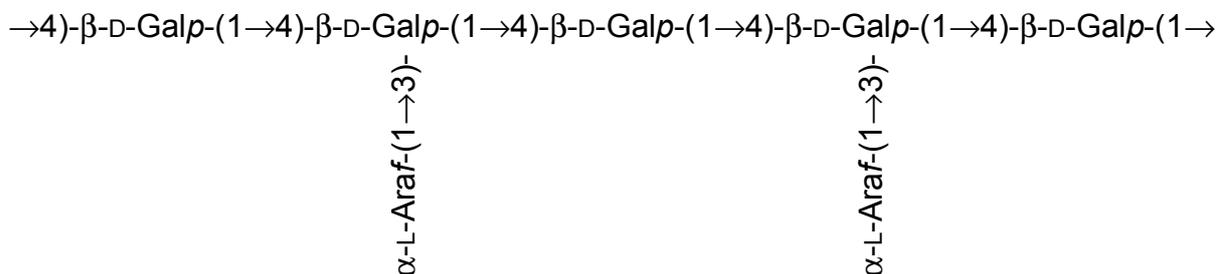


FIGURA 4 – Estrutura das arabinogalactanas tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

2.2.3. Ácidos Poligalacturônicos e Ramnogalacturonanas I

Os ácidos poligalacturônicos (PGAs) são homopolímeros helicoidais formados por unidades de ácido α -D-galacturônico (1 \rightarrow 4)-ligadas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). As cadeias helicoidais antiparalelas de PGAs são capazes de condensar-se pela ligação cruzada com o íon Ca^{2+} , formando as chamadas zonas de junção do ácido poligalacturônico (FIGURA 3).

Já as ramnogalacturonanas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico e ramnose (REID, 1997). TALMADGE et al. (1973), analisando polissacarídeos pécticos, descreveram uma ramnogalacturonana cuja estrutura era constituída por (1 \rightarrow 4) α -GalpA ligado, intercalado por resíduos de (1 \rightarrow 2) α -Rhap. Segundo eles, a ramnogalacturonana apresentava seqüências constituídas por grupos de [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] alternados com segmentos contendo aproximadamente 8 unidades de ácido galacturônico 1 \rightarrow 4 ligados. Além disso, aproximadamente metade das unidades de ramnose apresentaria ramificações em seu O-4.

As ramnogalacturonanas I (RG I) são heteropolímeros constituídos por repetições do grupo dissacarídico [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] (McNEIL et al., 1984; LAU et al., 1985; CARPITA e GIBEAUT, 1993). As RG I podem ser estendidas por ácido poligalacturônico em seus terminais e as unidades ramnosil podem também interromper longos períodos de ácido poligalacturônico. As RG I e os PGAs formam os dois principais constituintes da matriz péctica da parede celular dos vegetais superiores (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Existem também as ramnogalacturonanas II (RG II), as quais apresentam uma alta diversidade de açúcares, além de ramnose e ácido galacturônico, formando estruturas altamente complexas (CARPITA e GIBEAUT, 1993; REID, 1997).

As unidades de ramnose podem servir como pontos de ramificação da estrutura principal. Conseqüentemente, por causa da freqüência variável de unidades de ramnose, existem estruturas mais ramificadas que outras (REID, 1997).

RG I carregam cadeias laterais constituídas principalmente de unidades de açúcares neutros e nem todas as cadeias laterais foram ainda identificadas e caracterizadas totalmente. Ramnogalacturonanas I de diferentes plantas contêm

proporções variáveis de polissacarídeos neutros. Com base em suas altas massas molares, estes componentes devem ser diferenciados das cadeias relativamente curtas de RG I. Acreditava-se que os componentes pécticos neutros eram polissacarídeos distintamente separados. No entanto, hoje se sabe que, na parede celular, eles são ancorados por polissacarídeos pécticos ácidos constituindo grandes cadeias laterais (REID, 1997). Três principais tipos de cadeias laterais de RG I são conhecidos: as arabinanas, as galactanas e as arabinogalactanas (McNEIL et al., 1984; KOMALAVILAS e MORT, 1989).

As cadeias laterais das RG I estão fixadas no O-4 das unidades de ramnose (McNEIL et al., 1984). Em geral, quase metade das unidades de ramnose apresenta cadeias laterais, mas isto pode variar de acordo com o tipo celular e o estado fisiológico. Além disso, unidades de ácido galacturônico podem ser acetiladas na posição O-3 (KOMALAVILAS e MORT, 1989).

2.2.4. Xilanas

As xilanas são os mais abundantes polissacarídeos não-celulósicos da maioria das angiospermas. Constituem de 20 a 30% do peso seco dessas plantas e são principalmente encontradas nas suas paredes secundárias (ASPINALL, 1980).

Xilanas isoladas de diferentes espécies vegetais apresentam grande variedade estrutura, mas normalmente apresentam uma cadeia principal de (1→4)β-D-xilopiranosose. Muito poucas xilanas lineares de plantas foram isoladas. As heteroxilanas são as mais freqüentemente encontradas e apresentam as suas cadeias principais substituídas por diversos monossacarídeos neutros ou ácidos, ou ainda por oligossacarídeos (JOSELEAU et al., 1992; DINAND e VIGNON, 2001). Grupamentos O-acetil, geralmente, também estão presentes em xilanas (REICHER e CORRÊA, 1982; REICHER et al., 1984; REICHER et al., 1989; REICHER et al., 1994). A Figura 6 mostra as principais substituições encontradas nas heteroxilanas, sendo estas localizadas nos carbonos C-2 e C-3 das unidades de xilopiranosose.

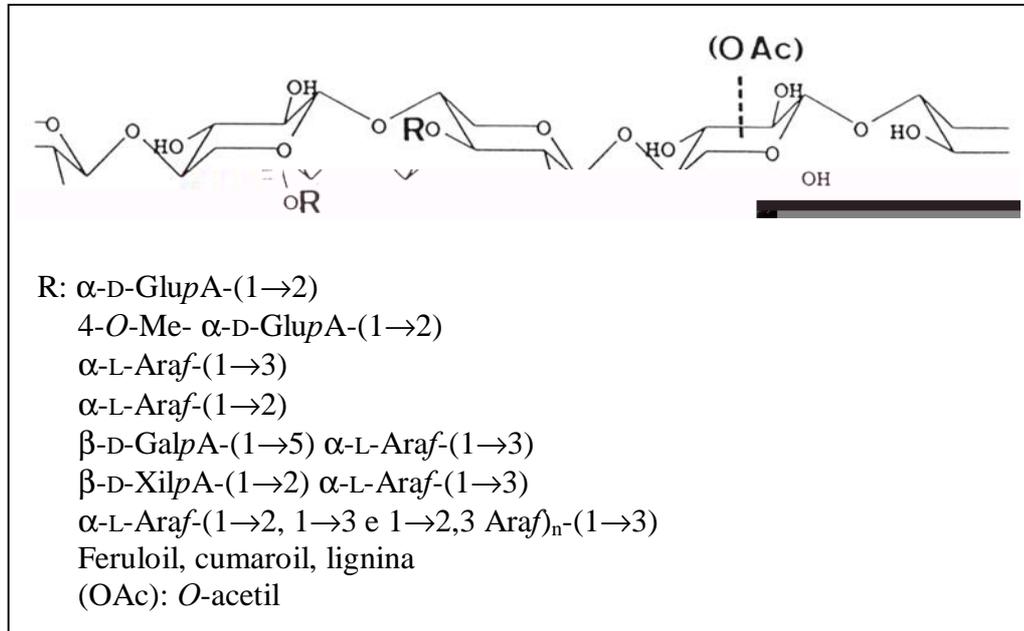
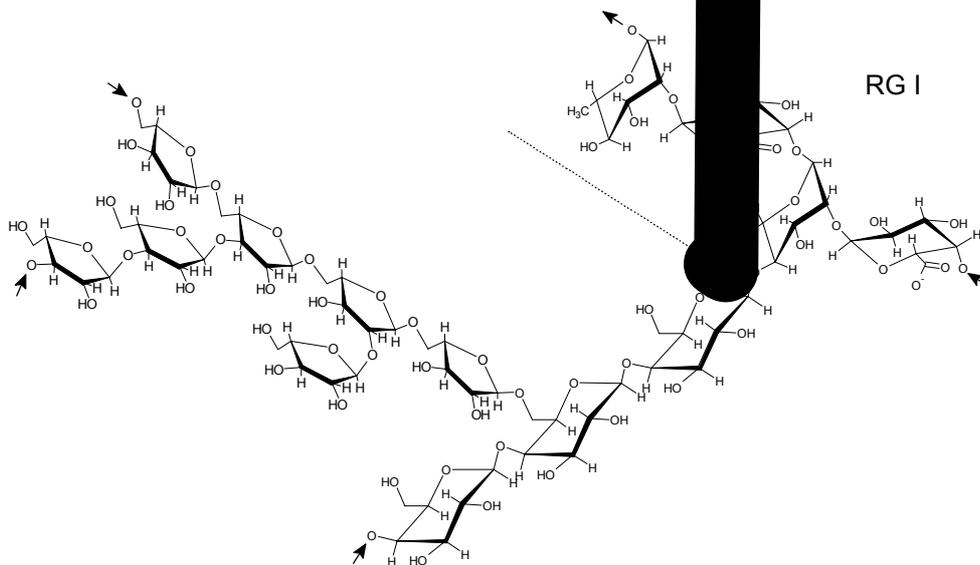


FIGURA 6 – Principais cadeias laterais substituintes das xilanas (JOSELEAU *et al.*, 1992).

As xilanas estão firmemente associadas às microfibrilas de celulose por meio de pontes de hidrogênio, com uma força de ligação inversamente proporcional ao grau de substituição da cadeia principal (VARNER e LIN, 1989). Algumas unidades ácidas, substituintes das xilanas, apresentam-se ligadas à lignina por ligação éster (DAS *et al.*, 1981). Além disso, elas também podem estar ligadas a proteínas na parede secundária (GREGORY *et al.*, 1998). Por causa destas fortes interações, são necessárias altas concentrações de álcali para a extração das xilanas (CARPITA, 1984; SUN *et al.*, 2001).

5. Polissacarídeos de *M. ilicifolia*

A partir de extração alcalina, utilizando KOH 2%, foi isolada uma arabinogalactana apresentando cadeia principal composta por unidades de β -Galp ($\rightarrow 4$) ligadas, com substituintes de Araf em O-6, sendo estas unidades de Araf substituídas em O-5, O-3, O-3,5 e O-2,5 (CIPRIANI et al., 2004). Esta arabinogalactana tipo I está provavelmente ligada ao extremo de algumas unidades de Rhap de uma ramnogalacturonana tipo I (Figura 7), formada pela repetição do grupo dissacarídico $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow]$, que é freqüentemente observado em pectinas de plantas. Também utilizando extração alcalina, mas com KOH 10%, foi isolada uma $(1\rightarrow 4)\beta$ -xilana linear (Figura 8) (CIPRIANI, 2003).



2.2.6. Atividades Biológicas de Polissacarídeos de Plantas

Atividades imunoestimulante, antitumoral, antiviral e anticoagulante são as mais comumente descritas para polissacarídeos obtidos das mais variadas fontes (BOHN e Be MILLER, 1995).

Polissacarídeos obtidos de plantas também têm demonstrado ser biologicamente ativos, incluindo atividade antiviral, antitumoral, imunoestimulante, antiinflamatória, anticomplemento, anticoagulante, hipoglicemiante e, também, atividade antiúlcera (SRIVASTAVA e KULSHVESHTHA, 1989; CAPEK et al., 2003; YAMADA, 1994; NERGARD et al., 2005).

2.2.7. Atividade Antiúlcera de Polissacarídeos

Um método comumente utilizado para a verificação da atividade antiúlcera de extratos de plantas consiste na verificação da proteção que o extrato proporciona contra lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (ROBERT et al., 1979).

A atividade antiúlcera de várias plantas, incluindo *Panax ginseng* (SUN et al., 1992a; SUN et al., 1992b); *Angelica sinensis* (CHO et al., 2000; YE et al., 2003), *Bupleurum falcatum* (YAMADA, 1994), *Cochlospermum tinctorium* (NERGARD et al., 2005) e *Strychnos potatorum* (SANMUGAPRIYA e VENKATARAMAN, 2007), tem sido atribuída a polissacarídeos presentes nos extratos avaliados. Apesar disso, apenas SUN et al. (1992b) e YAMADA (1994), estudando as plantas *Panax ginseng* e *Bupleurum falcatum*, respectivamente, avaliaram a atividade antiúlcera gástrica de polissacarídeos purificados, sendo ambos caracterizados como polissacarídeos pécticos, contendo altos teores de ácido galacturônico.

Os demais trabalhos mostraram apenas a atividade de extratos brutos contendo polissacarídeos em mistura (CHO et al., 2000; YE et al., 2003; NERGARD et al., 2005; SANMUGAPRIYA e VENKATARAMAN, 2007). NERGARD et al. (2005) relacionaram a atividade antiúlcera à presença de arabinogalactana tipo II péctica no extrato bruto avaliado.

Possíveis mecanismos para o efeito gastroprotetor dos polissacarídeos são a habilidade destes polímeros de se ligar à superfície da mucosa gástrica, atuando como uma camada protetora; atividade anti-secretora de suco gástrico; proteção da

mucosa pelo aumento da síntese de muco; e seqüestro de radicais livres (NERGARD et al., 2005; YAMADA, 1994; MATSUMOTO et al., 1993).

Polissacarídeos pécticos, obtidos por extração aquosa, estão entre os principais envolvidos com a atividade antiúlcera gástrica atribuída a polissacarídeos (SUN et al., 1992b; YAMADA, 1994; NERGARD et al., 2005). Dessa forma, acreditamos que a partir de uma extração aquosa branda popularmente utilizada para a produção de chá, tal como a infusão, polissacarídeos pécticos possam ser obtidos e, então, colaborar para a atividade farmacológica da *M. ilicifolia*.

ॐ नमो भगवते वासुदेवाय

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL DE ESTUDO

Folhas de *Maytenus ilicifolia*, coletadas em Campo Magro, na região metropolitana de Curitiba. Esse material foi gentilmente fornecido pela Central de Produção e Comercialização de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Paraná Ltda.

A amostra foi identificada pelo Prof. Dr. Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica da UFPR. Exemplares da mesma espécie, coletados em Curitiba, estão depositados no herbário do Departamento de Botânica da UFPR sob os números 30842 e 43795.

4.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.2.1. Obtenção de Polissacarídeos por Infusão

Frações de 100 g de folhas secas trituradas foram submetidas a extração por infusão com 1 litro de água destilada fervente, até a mistura atingir temperatura ambiente (~6 h). Um total de 2 kg de folhas foi utilizado. Os extratos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador até pequeno volume e precipitados com etanol (3 volumes) para a obtenção dos polissacarídeos. O material precipitado foi dialisado, concentrado em rotaevaporador e liofilizado.

Antes de iniciar os processos de fracionamento dos polissacarídeos, o material foi tratado com TCA 5% para desproteíntização. O material insolúvel em TCA foi separado por centrifugação. As frações solúvel e insolúvel em TCA foram, então, neutralizadas, dialisadas e liofilizadas.

4.2.2. Obtenção de Polissacarídeos por Extração Aquosa e Alcalina Sob Refluxo

4.2.2.1. Deslipidificação e despigmentação

Folhas trituradas (350 g) foram deslipidificadas e despigmentadas com clorofórmio-metanol (2:1 v/v; 1 l), sob refluxo em banho-maria, por 2 horas. Este processo foi repetido três vezes e o resíduo foi seco para ser submetido à extração dos polissacarídeos.

4.2.2.2. Extração aquosa

O resíduo seco da extração com clorofórmio-metanol foi submetido a extração aquosa (1 l), sob refluxo, por 3 horas (3 vezes). Após cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente. O material foi reunido, concentrado em rotaevaporador até pequeno volume, precipitado com etanol (3 volumes) e centrifugado a fim de separar o precipitado do sobrenadante. O precipitado foi, então, dialisado e liofilizado.

4.2.2.3. Extração alcalina

O resíduo da extração aquosa foi submetido a extração com KOH 2% (1 l), na presença de NaBH_4 , sob refluxo, por 3 horas (3 vezes). Após cada etapa, o extrato foi filtrado a quente. O material foi reunido, neutralizado com ácido acético glacial, concentrado até pequeno volume, dialisado e liofilizado.

O resíduo da extração anterior foi, em seguida, extraído com KOH 10% (1 l), sob refluxo em banho-maria, por 3 horas (3 vezes). Após cada etapa, o extrato foi filtrado a quente. O material foi reunido, neutralizado com ácido acético glacial, concentrado até pequeno volume, dialisado e liofilizado.

4.3. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.3.1. Fracionamento dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

As frações submetidas a este processo foram solubilizadas em água destilada, congeladas e, posteriormente, descongeladas à temperatura ambiente. O precipitado, insolúvel em água fria, foi separado por centrifugação (10.000 rpm / 15 min a 4 °C). Esse processo foi repetido diversas vezes, até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado após congelamento e descongelamento, e a partir do resíduo aquoso, após tentativa de solubilização em água, fosse obtido um sobrenadante límpido. Após essas etapas, os sobrenadantes e precipitados foram reunidos, concentrados e liofilizados.

4.3.2. Fracionamento dos Polissacarídeos pelo Método de Fehling

As frações submetidas ao fracionamento pelo método de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965) foram solubilizadas diretamente na solução B de Fehling (KOH + tartarato de sódio e potássio) e a estas se adicionou igual volume da solução A de Fehling (sulfato de cobre). Após forte agitação manual, o material permaneceu 24 h sob agitação mecânica. O precipitado obtido foi separado do sobrenadante por centrifugação (10.000 rpm / 15 min a 25 °C). Tanto o precipitado quanto o sobrenadante foram neutralizados com ácido acético, dialisados, agitados em suspensão aquosa de resina catiônica fortemente ácida para eliminar o cobre residual, e novamente dialisados. As frações, sobrenadante e precipitado de Fehling, foram concentradas e liofilizadas.

4.3.3. Tratamento com α -amilase

Polissacarídeo em uma concentração de 10 mg/ml foi tratado com α -amilase de *Bacillus licheniformis* (SIGMA). A reação ocorreu com 100 unidades/ml de enzima em tampão fosfato 20 mmol/l, pH 6,9, contendo 6,7 mmol/l de NaCl, a 20 °C por 30 min. Posteriormente a enzima foi removida por precipitação com TCA 5%, seguida de centrifugação. O sobrenadante foi, então, dialisado e liofilizado.

4.3.4. Fracionamento dos Polissacarídeos por Ultrafiltração e Diálise

A fração submetida a este processo foi ultrafiltrada em membranas com limites de exclusão de 300 e 30 kDa (Millipore), respectivamente. As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração modelo 16249 (Sartorius), acoplado a um cilindro de ar comprimido.

Posteriormente, o material eluído na membrana com limite de exclusão de 30 kDa foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 16 kDa, rendendo duas frações: uma dialisável e uma não-dialisável.

4.4. ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS

4.4.1. Composição Monossacarídica

As composições monossacarídicas foram determinadas após a hidrólise de 2 mg dos polissacarídeos, com 1 ml de TFA 2 mol/l, a 100 °C em estufa, por 8 h. As soluções foram evaporadas até a secura e o resíduo dissolvido em 1 ml de H₂O, ao qual 2 mg de NaBH₄ ou NaBD₄ foram adicionados. Após 18 h, ácido acético foi adicionado, as soluções evaporadas até a secura e o ácido bórico resultante removido como borato de trimetila, por repetidas evaporações com metanol (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v; 2 ml), à temperatura ambiente, “overnight”. As reações foram interrompidas com gelo e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio, o qual foi lavado diversas vezes com solução aquosa de CuSO₄ a 5% para a eliminação da piridina residual. A fase clorofórmica foi, então, desidratada com Na₂CO₃ anidro, filtrada e evaporada à temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons.

4.4.2. Metilação dos Polissacarídeos e Análise na Forma de Acetatos de Alditóis

Os polissacarídeos (5 mg) foram metilados pelo método de CIUCANU e KEREK (1984). O polissacarídeo a ser metilado foi solubilizado em 1 ml de Me₂SO. Excesso de NaOH triturado e seco foi adicionado à solução, seguido pela adição de 1 ml de CH₃I, agitação em vortex por 30 min e repouso por 24 h. A metilação foi interrompida com água destilada sob banho de gelo e a solução acidificada com ácido acético. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água destilada. A fase clorofórmica foi evaporada e o material hidrolisado com H₂SO₄ 50% (v/v; 0,5 ml) por 1 h a 0 °C, seguido pela diluição a 5,5% (v/v; adição de 4,0 ml de água destilada) e aquecimento a 100 °C por 17 h (SAEMAN et al., 1954). O material hidrolisado foi neutralizado com BaCO₃, filtrado, reduzido com NaBD₄ e acetilado (item 3.4.1). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976; SASSAKI et al., 2005).

4.4.3. Degradação Controlada de Smith

O polissacarídeo (300 mg) submetido a degradação controlada de Smith foi oxidado com 30 ml de NaIO₄ 0,05 mol/l, à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 72 h. A reação foi interrompida pela adição de etilenoglicol, a solução foi dialisada, e os polialdeídos resultantes foram reduzidos com NaBH₄. Após neutralização com ácido acético e diálise, o material foi parcialmente hidrolisado com TFA pH 2,0, por 30 min a 100 °C (HAY et al., 1965). Em seguida, o material foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 2 kDa e liofilizado.

4.4.4. Carboxi-Redução

O processo de carboxi-redução foi realizado segundo TAYLOR e CONRAD (1972), e consiste na reação de ácidos carboxílicos com carbodiimidas, gerando ésteres que podem ser reduzidos na presença de NaBH₄. Neste caso, as unidades

de ácidos urônicos de um polissacarídeo são convertidas no seu açúcar neutro correspondente.

O polissacarídeo (100 mg) a sofrer carboxi-redução foi dissolvido em 10 ml de tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 mol/l, pH 4,75) e a este se adicionaram, pouco a pouco e sob agitação, 24 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida] para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A mistura de reação ficou sob agitação por um total de duas horas. Em seguida, adicionou-se tampão TRIS (2 mol/l, pH 7,0) até pH 7,0 (5 ml) e, posteriormente, acrescentou-se NaBH₄ para uma concentração final de 2 mol/l (1,13 g). A redução ocorreu “overnight” e foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5. Finalmente, o material foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 8.000 Da durante 48 horas, concentrado e liofilizado. Todo o processo de carboxi-redução foi repetido mais uma vez, para garantir a eficácia do procedimento. A única diferença foi que, no segundo processo, apenas a metade de carbodiimida foi utilizada.

4.5. TESTE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR

4.5.1. Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance com Detector de Espalhamento de Luz de Multiângulos (HPSEC-MALLS)

Os ensaios de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizados no aparelho da Wyatt Technology, equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alta *performance* (HPSEC), com quatro colunas *ultrahydrogel* 2000, 500, 250 e 120 acopladas em série (com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$, respectivamente), um detector de índice de refração, modelo Waters 2410, e um detector de espalhamento de *laser* multiângulo (MALLS) a 632,8 nm, modelo Dawn DSP, que promove a leitura do espalhamento de luz, que é captado em diferentes intensidades por detectores em diferentes ângulos.

Como eluente, foi usada uma solução de NaNO₂ 0,1 mol/l contendo NaN₃ 0,2 g/l, com fluxo controlado de 0,6 ml/min. As amostras foram solubilizadas na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/ml, e filtradas através de

membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,22 μm . Uma quantidade de 200 μl foi injetada e os resultados foram obtidos com o *software* ASTRA 4.70.07.

A obtenção da massa molar foi realizada após a determinação da taxa de variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc), para as amostras que apresentaram um perfil homogêneo de eluição, uma vez que essa é uma característica específica de cada molécula. A amostra foi solubilizada na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/ml, e filtrada através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,45 μm . A amostra foi diluída para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/ml e analisada utilizando-se apenas o detector de índice de refração, com as colunas desacopladas. O fluxo do solvente foi de 0,1 ml/min, uma quantidade de 200 μl de amostra foi injetada no equipamento e os resultados foram obtidos com o *software* ASTRA 4.70.07.

4.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1. Método Cromatográfico

4.6.1.1. Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa foi realizada em cromatógrafo Varian Saturn 2000R – 3800 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 2000R, utilizando a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 ml/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis foram analisados a uma temperatura de 50 – 220 $^{\circ}\text{C}$ (40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e os acetatos de alditóis parcialmente metilados a uma temperatura de 50 – 215 $^{\circ}\text{C}$ (40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

4.6.2. Método Espectroscópico

4.6.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance-DRX-400 MHz, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram analisadas em uma sonda invertida de 5 mm de diâmetro, às temperaturas de 50 °C ou 70 °C, utilizando como solventes D₂O ou Me₂SO-*d*₆. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m. e acetona (δ 30,2) ou Me₂SO-*d*₆ (δ 39,5) foram utilizados como padrões internos.

4.6.3. Métodos Espectrofotométricos

4.6.3.1. Dosagem de ácidos urônicos

A determinação de ácidos urônicos foi realizada segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Foi utilizado 0,4 ml de amostra (sensibilidade de 2 – 38,8 μ g de ácido urônico em 0,4 ml), sobre a qual adicionaram-se 40 μ l de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 mol/l (pH 1,6). Em seguida, foram adicionados 2,4 ml de tetraborato de sódio (75 mmol/l em ácido sulfúrico). A solução foi agitada em vortex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após resfriar os tubos até a temperatura ambiente (em banho de gelo), adicionaram-se 80 μ l de meta-hidroxibifenila (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v) e agitou-se novamente em vortex. A presença de ácidos urônicos é visualizada pelo aparecimento de uma coloração rósea. A sensibilidade do método é de 0,97-38,8 μ g de ácido urônico (em 0,4 ml de amostra), com leitura em 525 nm. O ácido glucurônico foi utilizado como padrão.

4.6.3.2. Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada pela precipitação das proteínas pelo método de PETERSON (1977) e determinação pelo método de HARTREE

(1972). Para a precipitação utilizou-se 1 ml de amostra sobre a qual foi adicionado 0,1 ml de deoxicolato (0,15%). A solução foi agitada e mantida por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 0,1 ml de TCA (72%), agitou-se e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 ml de água destilada para a determinação de proteínas. Sobre esse 1 ml 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 1 mol/l são dissolvidos em 1000 ml de água destilada q.s.p.). A solução permaneceu em banho-maria a 50 °C durante 10 min. Em seguida ela foi resfriada até a 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 1 mol/l), permanecendo 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 3 ml do reagente C (1 ml de reagente de Folin Ciocalteau 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 presença de proteínas é visualizada pelo aparecimento de uma coloração arroxeada. A sensibilidade do método é de 10-100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, com leitura em 650 nm. Soroalbumina bovina foi utilizada como padrão.

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA

4.7.1. Animais

Ratos Wistar fêmeas (180-200 g) do biotério da UFPR mantidos sob condição-padrão de laboratório (ciclo de 12 h dia/noite e temperatura de 22 ± 2 °C). Ração (Nuvital[®], Curitiba/PR, Brasil) e água foram disponibilizadas *ad libitum*. Os animais foram deixados em jejum por um período de 15-18 h antes do experimento.

4.7.2. Indução de Lesão Gástrica Aguda em Ratos

Ratos em jejum (n = 6 animais por grupo) foram tratados oralmente com veículo (H₂O, 0,1 ml/100 g de peso corpóreo), omeprazol (40 mg/kg), AG (3, 10, 30 mg/kg), PGA (1, 10, 100 mg/kg) ou HX (10, 30, 100 mg/kg) 1 h antes da administração de etanol 75% ou 80% v/v (0,5 ml/200 g). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 1 h após o tratamento com etanol (ROBERT et al., 1979). Os estômagos foram removidos, a mucosa gástrica exposta e a lesão gástrica quantificada usando a seguinte fórmula: área lesionada (mm²) = comprimento da lesão (mm) x largura da lesão (mm), como descrito por (ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

4.7.3. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro médio padrão. A significância estatística dos resultados foi determinada usando análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados foram considerados diferentes para um nível de significância de $p < 0,05$. A dose efetiva 50% (ED₅₀) foi calculada pela adaptação dos danos na equação: $V_i/V_o = 1/(1 + [I]/IC_{50})$, usando o KhaleidaGraph 3.0 para Windows (Synergy Software, PA, USA), onde V_i = atividade total, V_o = atividade residual.

4.8. OBTENÇÃO DO COMPOSTO VASORRELAXANTE

4.8.1. Extração com Clorofórmio-Metanol

Folhas trituradas (118 g) foram deslipidificadas com a mistura de solventes clorofórmio-metanol (2:1 v/v; 0,5 l), sob refluxo em banho-maria, por 2 horas (3 vezes). Após cada etapa, o extrato clorofórmio-metanólico foi filtrado a quente. No final do processo, o resíduo foi seco para sofrer o próximo processo de extração.

4.8.2. Extração com Metanol-Água

O resíduo da extração com clorofórmio-metanol foi submetido a extração com metanol-água (4:1 v/v; 0,5 l), sob refluxo em banho-maria, por 2 horas (2 vezes). Após cada etapa, o extrato metanol-aquoso foi filtrado a quente. No final do processo, o resíduo foi seco para, finalmente, sofrer extração aquosa.

4.8.3. Extração Aquosa

O resíduo da extração com metanol-água foi submetido a extração aquosa (0,5 l), sob refluxo em banho-maria, por 3 horas (2 vezes). Após cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente, concentrado em rotaevaporador até pequeno volume, precipitado com etanol (3 volumes) e centrifugado, a fim de separar o precipitado do sobrenadante. A fração solúvel em etanol foi evaporada até a secura em rotaevaporador, solubilizada em pequeno volume de água destilada e liofilizada, rendendo a fração denominada ES.

4.9. PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DO COMPOSTO VASORRELAXANTE

A presença do composto vasoativo, nas frações obtidas pelos processos de purificação, foi verificada pela análise do efeito vasorrelaxante de cada fração. Esta etapa do trabalho foi realizada no Depto. de Farmacologia deste Setor, pela Ms. Yanna Dantas Rattmann, sob a orientação dos professores Dr. José Eduardo da Silva Santos e Dr^a. Maria Consuelo A. Marques.

4.9.1. Determinação do Efeito Vasorrelaxante

A avaliação do efeito vasorrelaxante foi realizada em anéis de aorta de ratos com endotélio vascular íntegro, previamente contraídos pela incubação com fenilefrina (1 μ M). Durante a fase tônica da contração, ES ou as frações resultantes do seu fracionamento, foram administradas. Os registros das respostas vasculares foram obtidos por meio de um sistema composto por transdutores isométricos

(modelos TRI 210 da Letica Scientific Instruments e F1202 da CB Sciences, EUA), acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, EUA), conectados a um computador contendo um software de integração (Chart v3.6.8, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, EUA).

4.9.2. Partição Líquido/Líquido de ES

ES (1 g) foi solubilizado em 60 ml de água e particionado com 30 ml de acetato de etila (3 vezes). As frações aquosa e orgânica foram concentradas, liofilizadas e analisadas quanto à atividade vasorrelaxante.

4.9.3. Fracionamento da Fração Acetato de Etila

Após a partição líquido/líquido, o material presente na fração acetato de etila (90 ml) apresentou-se solúvel. Contudo, depois de liofilizado, parte do material apresentou-se insolúvel quando tratado com pequeno volume de acetato de etila (20 mL). A solubilização completa só foi alcançada por aquecimento, mas, com o resfriamento da solução, parte do material voltava a precipitar. Esta parte foi separada por centrifugação. As frações solúvel e insolúvel em pequeno volume de acetato de etila foram analisadas quanto à atividade vasorrelaxante.

4.9.4. Análise do Composto Vasoativo (RMN-¹³C e GC-MS)

Análise de RMN-¹³C foi realizada em espectrômetro Bruker (item 4.6.2.1), utilizando uma sonda invertida de 5 mm de diâmetro, Me₂SO-*d*₆ como solvente e temperatura de 40 °C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m, relativos ao Me₂SO-*d*₆ em δ 39.5.

Análise de GC-MS foi realizada em cromatógrafo Varian (item 4.6.1.1), utilizando a coluna capilar DB-225MS (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1,5 ml/min, como gás de arraste. A temperatura de análise foi mantida em 50 °C por 3 min e, então, elevada até 215 °C a 40 °C/min, mantendo esta temperatura até o final da análise (60 min). A amostra (fração ES) foi derivatizada com bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) em piridina (1:1 v/v) por 15 min, em estufa

a 100 °C. Os derivados trimetilsilil (TMS) resultantes foram extraídos com clorofórmio e analisados. Catequina-TMS e epicatequina-TMS foram identificadas pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons, quando comparados com padrões de catequina-TMS e epicatequina-TMS, preparados a partir de padrões não-derivatizados Sigma.

4.9.5. Quantificações de Catequina e Epicatequina Presentes em ES por HPLC

As análises foram realizadas em cromatógrafo SHIMADZU (LC-10A) com detecção por UV em 280 nm (SPD-10A) à temperatura de 25 °C. Foi utilizada uma coluna Phenomenex Synergi Fusion-RP 80 (4 μ , 4,6 x 250 mm) a 25 °C. A fase móvel foi uma mistura de duas soluções (25% da solução B em A) desgaseificada com gás hélio: A = 1% de ácido acético em água (Milli-Q); B = acetonitrila:água:ácido acético em uma proporção de 50:49:1. O fluxo utilizado foi de 0,8 ml/min. As amostras foram solubilizadas em água ultrapura, filtradas através de membranas de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio de poros de 0,22 μ m e, então, analisadas. O volume de injeção foi de 10 μ l e os picos referentes à catequina e à epicatequina foram identificados comparando os tempos de retenção com os padrões Sigma. Os parâmetros utilizados neste ensaio foram adaptados de SOARES et al. (2004).

Para a construção das curvas de calibração, soluções aquosas de catequina e epicatequina padrão, foram preparadas nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μ g/ml. As soluções foram filtradas através de membranas de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio de poros de 0,22 μ m. As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear e os resultados representam a média de três curvas obtidas por três injeções de cada concentração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. POLISSACARÍDEO DO INFUSO

5.1.1. Extração e Purificação

O chá de *M. ilicifolia* é popularmente preparado a partir da infusão de suas folhas com água fervente. Para a obtenção dos polissacarídeos extraídos e ingeridos no chá popular, folhas secas e moídas de *M. ilicifolia* sofreram extração por infusão. A extração e as etapas de purificação dos polissacarídeos são mostradas resumidamente na Figura 9.

Os componentes de alta massa molar do infuso foram separados dos de baixa massa por tratamento com etanol, o qual resultou em um precipitado (1,27 g%) contendo 8,6% de proteínas, além dos polissacarídeos. TCA 5% foi utilizado para promover a remoção das proteínas por precipitação. O sobrenadante obtido apresentou teor < 1% de proteínas e foi submetido ao processo de fracionamento por congelamento e degelo, que resultou num precipitado. O sobrenadante do processo anterior, que contém os polissacarídeos solúveis em água fria, foi tratado com solução de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965). O componente sobrenadante da precipitação de Fehling (SobFeh) continha 10% de glucose e apresentou um perfil heterogêneo quando analisado por cromatografia de exclusão estérica de alta *performance* (HPSEC) (Figura 10). Antes de passar para a próxima etapa de fracionamento, a fração SobFeh foi tratada com α -amilase, que reduziu o seu conteúdo de glucose de 10% para 2%. O material foi, então, submetido a ultrafiltração em membranas com limites de exclusão de 300 e 30 kDa e a diálise em membrana com limite de exclusão de 16 kDa, sucessivamente. Ao final das ultrafiltrações e da diálise, foram obtidas quatro frações:

- 1 – Material retido na ultrafiltração em membrana de 300 kDa (300R);
- 2 – Material retido na ultrafiltração em membrana de 30 kDa (30R);
- 3 – Material não-dialisável em membrana de 16 kDa (AG);
- 4 – Material dialisável em membrana de 16 kDa (16D).

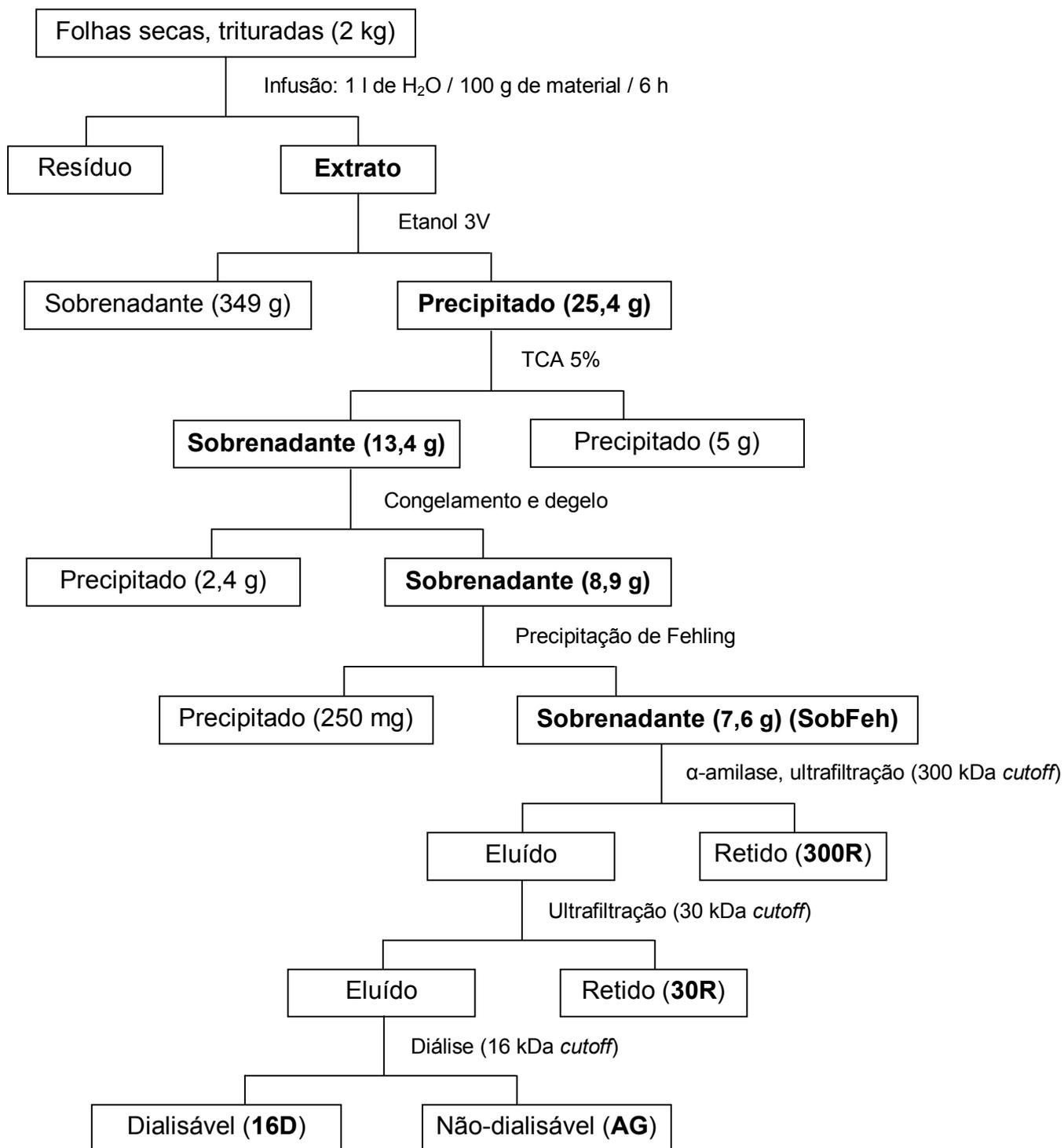


FIGURA 9 – Fluxograma do processo de extração e purificação dos polissacarídeos obtidos pela infusão das folhas de *M. ilicifolia*.

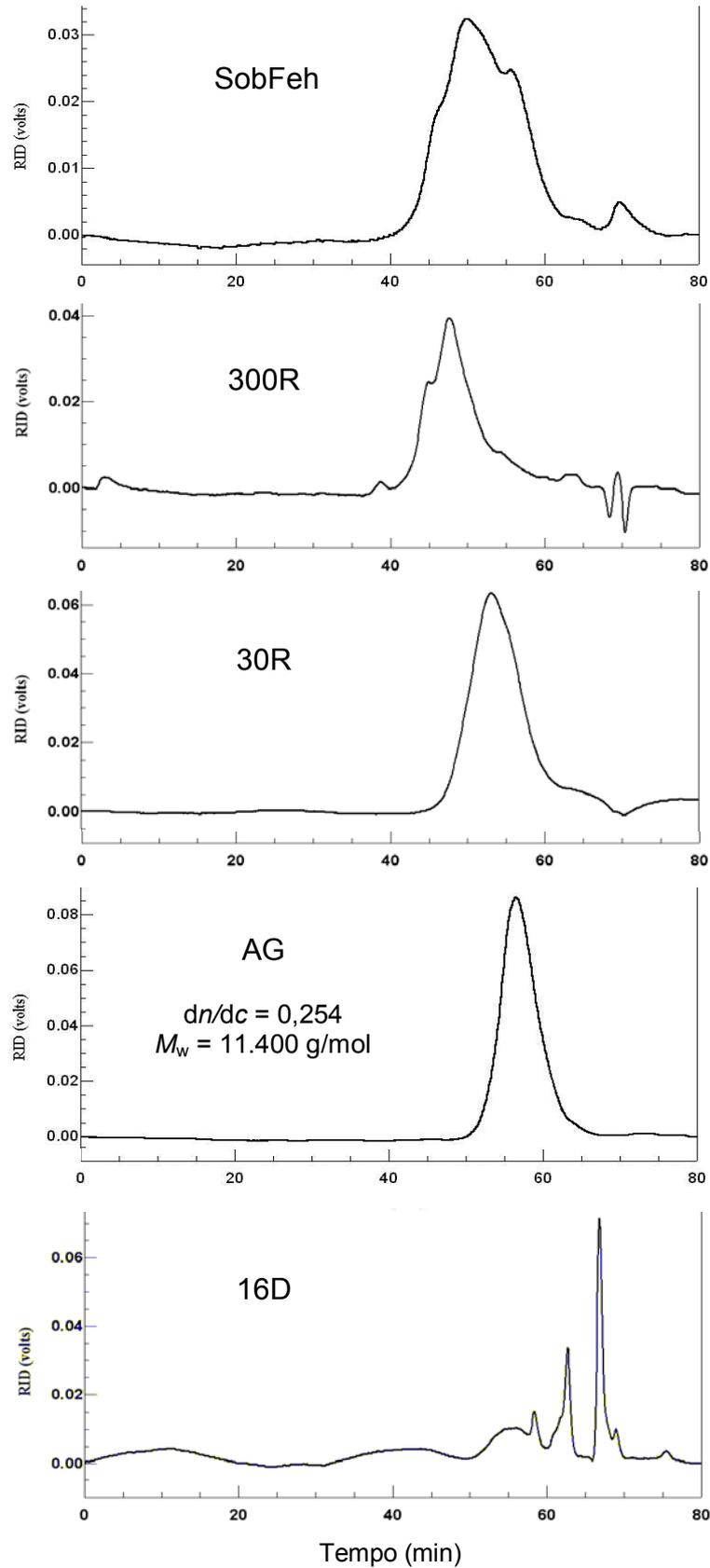


FIGURA 10 – Perfis de eluição em HPSEC, utilizando detector de índice de refração (RID), das frações SobFeh, 300R, 30R, AG e 16D, obtidas pelos processos de purificação dos polissacarídeos extraídos pela infusão das folhas de *M. ilicifolia*. Valores de dn/dc e M_w são mostrados para o polissacarídeo homogêneo AG.

Análises em HPSEC mostraram que apenas a fração AG apresentou perfil homogêneo de eluição (Figura 10). Isso possibilitou o cálculo do dn/dc e da massa molar média (M_w) de AG, que corresponderam a 0,254 e 11.400 g/mol, respectivamente. Este polissacarídeo apresentou arabinose, galactose, ácido urônico, ramnose e glucose numa proporção de 42:41:11:4:2, e por causa do seu alto teor de arabinose e galactose, foi classificado como um polissacarídeo pertencente à classe das arabinogalactanas.

O processo de purificação dos polissacarídeos do infuso foi acompanhado pela análise da composição monossacarídica de todas as frações obtidas no curso do fracionamento (Tabela 1), bem como por análises de HPSEC e RMN-¹³C das frações 300R, 30R e AG (Figuras 10 e 11, respectivamente).

Analisando a Tabela 1, pode-se observar que arabinose e galactose são os principais monossacarídeos presentes em praticamente todas as frações, indicando que o principal tipo de polissacarídeo obtido pela infusão é arabinogalactana. Embora apenas a fração AG tenha apresentado um perfil homogêneo em HPSEC após os processos de purificação (Figura 10), a alta similaridade dos sinais dos carbonos anoméricos nas análises de RMN-¹³C das frações 300R, 30R e AG (Figura 11) sugere que essas frações são formadas pelo mesmo polissacarídeo, diferindo apenas em relação à massa molar (Figura 10).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO INFUSO DAS FOLHAS DE *Maytenus ilicifolia*.

Frações	⁽¹⁾ Rendimento		Monossacarídeos (%)							
	g	%	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	⁽²⁾ Ác
Ppt etanólico	25,4	1,27	5	1	32	2	2	30	21	7
Sob TCA	13,4	0,67	4	1	36	2	2	34	15	6
Sob C/D	8,9	0,45	3	1	36	2	2	35	15	6
Ppt C/D	2,4	0,12	8	1	26	5	3	21	36	-
Sob Feh	7,6	0,38	2	-	42	1	1	37	10	7
Ppt Feh	0,25	0,01	3	2	15	10	16	23	22	9
300R	3,7	0,19	2	-	45	1	-	45	2	5
30R	1,9	0,10	2	-	44	1	-	45	2	6
AG	1,4	0,07	4	-	42	-	-	41	2	11
16D	0,16	0,01	4	-	41	-	6	41	5	3

NOTAS: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Partindo de 2 kg de folhas secas; (2) determinação de ácidos urônicos segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Rha (ramnose); Fuc (fucose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); Ác (ácido urônico); Ppt (precipitado); Sob (sobrenadante); C/D (congelamento e degelo); Feh (Fehling).

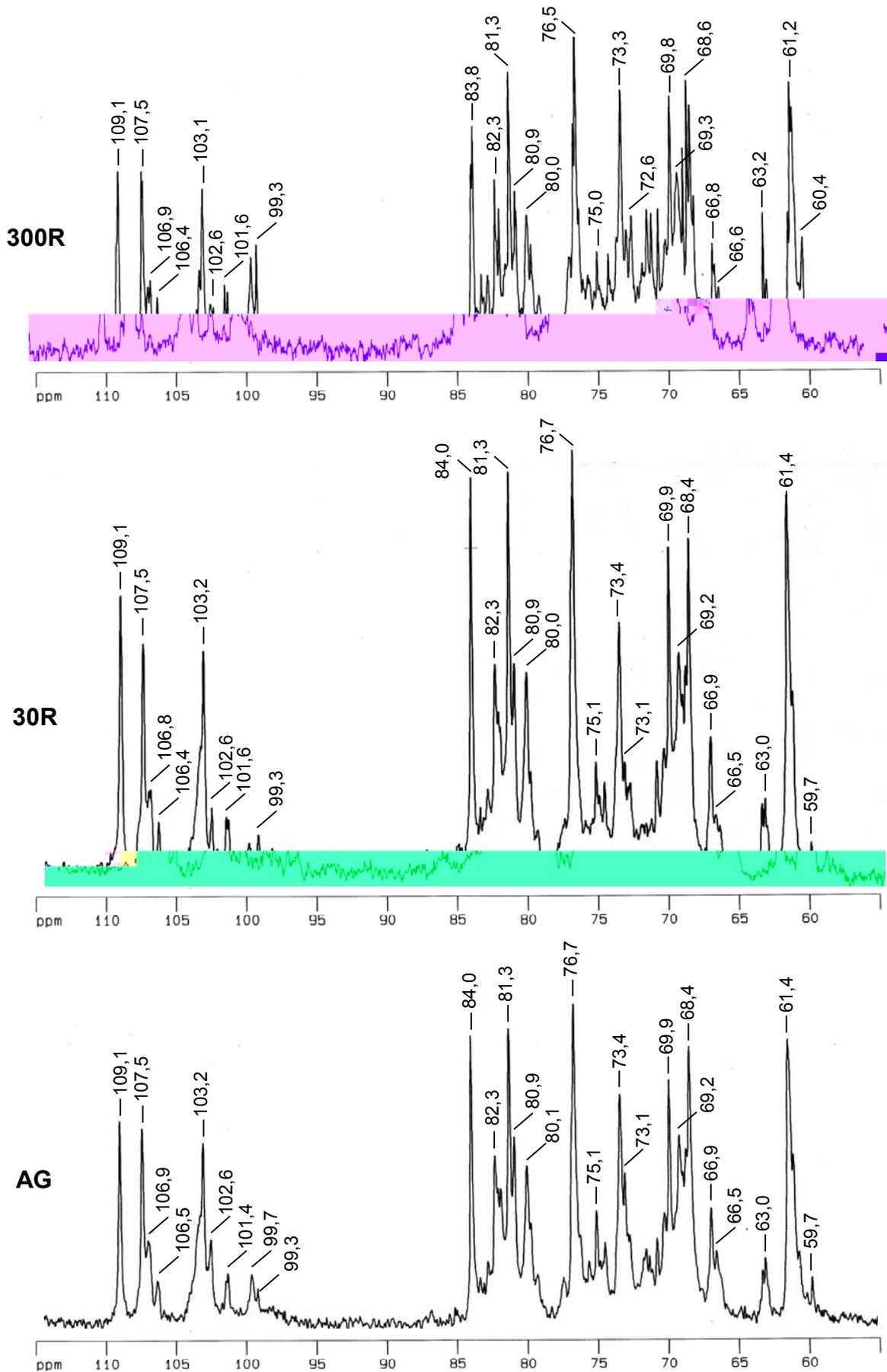


FIGURA 11 – Espectros de RMN- ^{13}C mostrando a similaridade das frações 300R, 30R e AG, obtidas pelos processos de purificação dos polissacarídeos extraídos pela infusão das folhas de *M. ilicifolia*. Experimentos realizados em D_2O , a $50\text{ }^\circ\text{C}$, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

5.1.2. Caracterização Estrutural de AG

Conforme apresentado anteriormente, AG é uma arabinogalactana contendo arabinose, galactose, ácido urônico, ramnose e glucose numa proporção de 42:41:11:4:2 (Tabelas 1 e 2) e com M_w de 11.400 g/mol.

O espectro de RMN- ^{13}C de AG (Figura 12A) mostrou um polissacarídeo complexo, com muitos sinais na região de C-1 (δ 99,3 – 109,1). Embora ele contenha 11% de ácidos urônicos, nenhum sinal para grupos carboxílicos foi observado. Sinais em δ 106,5, 106,9, 107,5 e 109,1 foram atribuídos ao C-1 de unidades de α -L-Araf (DELGOBO et al., 1998; TISCHER et al., 2002; FRANSEN et al., 2000), e aquele em δ 103,2 ao C-1 das unidades de β -D-Galp (DELGOBO et al., 1998; TISCHER et al., 2002; FRANSEN et al., 2000; GORIN e MAZUREK, 1975). Os sinais em δ 16,7 e 99,7 foram atribuídos ao CH_3 -6 e ao C-1 das unidades de α -L-Rhap, respectivamente (GORIN e MAZUREK, 1975; RENARD et al., 1998).

A análise de metilação (Tabela 3) mostrou que AG é um polissacarídeo altamente ramificado, contendo terminais não-redutores de Araf (2,3,5-Me₃-Ara) (21.5%) e Galp (2,3,4,6-Me₄-Gal) (2%). As unidades de Ara foram substituídas em O-5 (Araf) e/ou O-4 (Arap), e O-3, em acordo com os derivados 2,3-Me₂-Ara (14.5%), e 2,5-Me₂-Ara (6%), respectivamente. Contudo, de acordo com o espectro de RMN- ^{13}C (Figura 12A), a grande maioria das unidades de Ara está na forma de α -Araf (δ 106,5 – 109,1). As unidades de Galp são 3-O-, 3,6-d14.8 0 TD021.025 Tc0

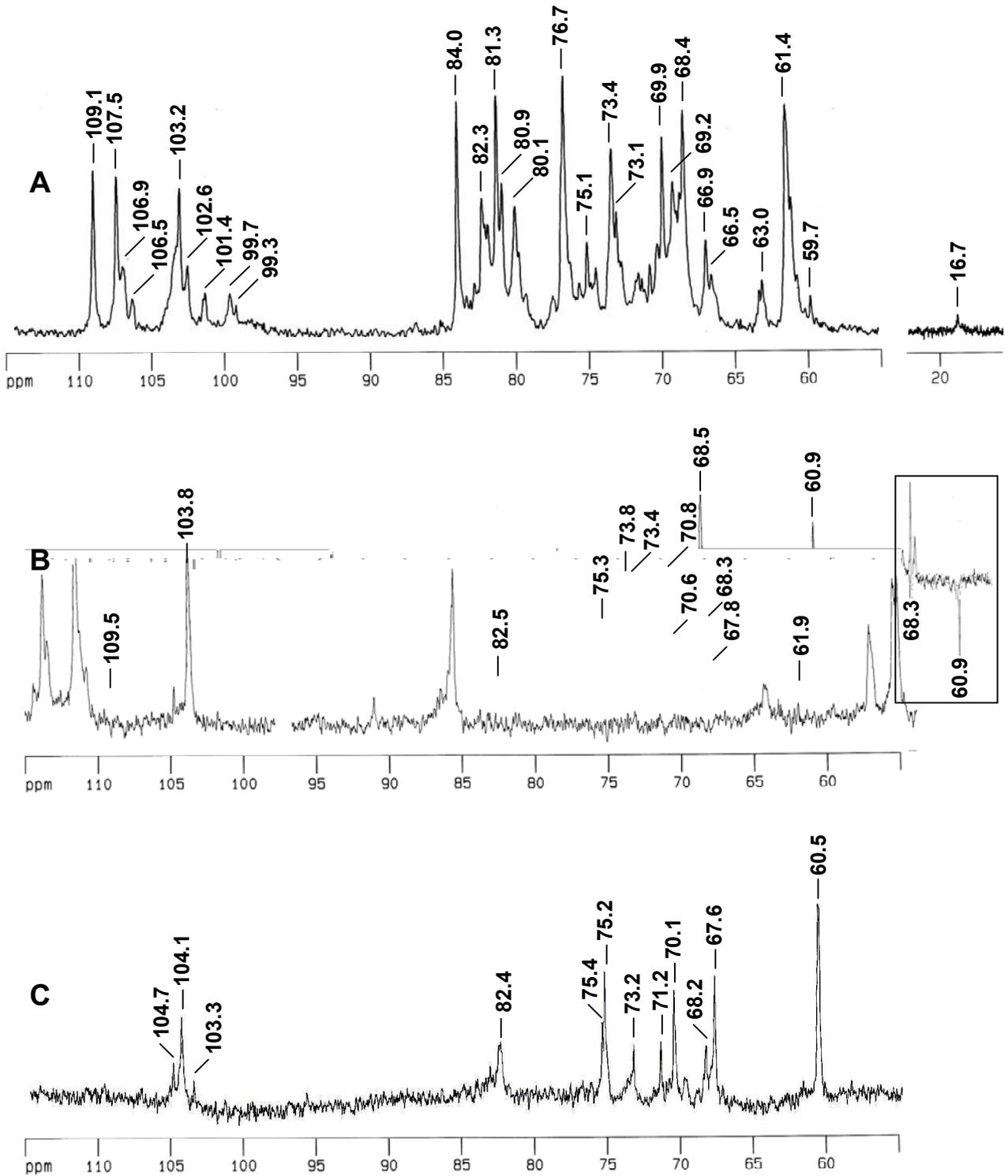


FIGURA 12 – Espectros de RMN- ^{13}C da arabinogalactana AG (A) e dos polissacarídeos obtidos após um (AG-OR; B) e dois (AG-OR2; C) processos de degradação controlada de Smith realizados sobre AG. Experimentos realizados em D_2O (A) ou $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ (B e C), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. DEPT de AG-OR (inserto em B).

5.1.2.1. Caracterização estrutural de AG: carboxi-redução

A estrutura do ácido urônico encontrado em AG foi determinada após sua carboxi-redução. Este processo transformou o monossacarídeo ácido em seu monossacarídeo neutro correspondente. O produto neutro (AG-CR) continha Ara, Gal, 4-O-Me-Glc, Rha e Glc em uma proporção molar de 42:47:5:4:2 (Tabela 2). O aumento do conteúdo de Gal de 41% para 47% e o aparecimento de 4-O-Me-Glc após a carboxi-redução indicaram que unidades de GalA e 4-O-Me-GlcA estavam presentes em AG. Dessa forma, os sinais no RMN-¹³C (Figura 12A) em δ 99,3 e 59,7 foram atribuídos ao C-1 das unidades de α -GalpA (RENARD et al., 1998) e ao CHOCH₃-4 (MAURER-MENESTRINA et al., 2003) das unidades de 4-O-Me-GlcpA, respectivamente.

A análise de metilação de AG-CR (Tabela 3) mostrou que as unidades de 4-O-Me-GlcpA presentes em AG são todas terminais não-redutoras, de acordo com a presença de 2,3,4,6-Me₄-Glc (5%). Além disso, as unidades de GalA presentes em AG são 4-O-substituídas, como mostrado pelo aparecimento do derivado metilado 2,3,6-Me₃-Gal (5%) em AG-CR. A presença de 3,4-Me₂-Rha (1%) e 3-Me-Rha (3%) indicou que unidades de Rhap 2-O- e 2-4-di-O-substituídos estão também presentes. Unidades de GalA 4-O-substituídas e Rha 2-O- e 2-4-di-O-substituídas são componentes normais de ramnogalacturonanas do tipo I (RGI) (DONG e FANG, 2001; CARPITA e GIBEAUT, 1993). Estes polissacarídeos são formados pela repetição de grupamentos [→4)- α -D-GalpA-(1→2)- α -L-Rhap-(1→], freqüentemente tendo o C-4 das unidades de Rha substituídas por arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Assim, é proposto que as unidades de GalA e Rha sejam originárias de uma RGI.

5.1.2.2. Caracterização estrutural de AG: degradação controlada de Smith

Com o objetivo de obter a cadeia principal de AG, foi realizada uma degradação controlada de Smith (HAY et al., 1965). De 500 mg de AG, foram obtidos 130 mg de um polissacarídeo resistente à oxidação por NaIO₄, o qual foi denominado AG-OR. Este continha Gal e Ara em uma proporção molar de 97:3 (Tabela 2). As unidades de ácido urônico e a grande maioria das unidades de Ara

foram eliminadas pela oxidação com periodato, indicando que elas eram componentes de cadeias laterais de AG.

O espectro de RMN-¹³C de AG-OR (Figura 12B) apresentou sinais em δ 103,8 e 109,5 referentes ao C-1 das unidades de β -Galp e α -Araf, respectivamente. Os sinais em δ 68,3 (Figura 12B – inserto) e 82,5 pertencem aos C-6 e C-3 ligados das unidades de β -Galp, respectivamente.

A análise de metilação (Tabela 3) mostrou que as unidades de Ara presentes em AG-OR são todas terminais não-redutoras, de acordo com a presença apenas do derivado 2,3,5-Me₃-Ara (3%). Terminais não-redutores de Galp também estão presentes, como mostrado pelo aparecimento do derivado 2,3,4,6-Me₄-Gal (19%). Os outros derivados encontrados em AG-OR foram 2,4,6-Me₃-Gal (24%), 2,3,4-Me₃-Gal (29%) e 2,4-Me₂-Gal (25%), indicando que a cadeia principal de AG é constituída por unidades de Galp 3-O-, 6-O, e 3,6-di-O-substituídas.

AG-OR (80 mg) foi submetido a uma segunda degradação controlada de Smith, rendendo 25 mg de um polissacarídeo resistente à oxidação (AG-OR2). Este continha 100% de unidades de Gal (Tabela 2), as quais foram distribuídas em terminais não-redutoras (20%), 6-O- (3%), 3,6-di-O-substituídas (14%), e principalmente 3-O-substituídas (63%), de acordo com o aparecimento dos derivados metilados 2,3,4,6-Me₄-Gal, 2,3,4-Me₃-Gal, 2,4-Me₂-Gal e 2,4,6-Me₃-Gal, respectivamente (Tabela 3). Concordando com os resultados de metilação, a análise de RMN-¹³C de AG-OR2 (Figura 12C) mostrou um aumento do sinal em δ 82,4, o qual corresponde ao C-3 3-O-substituído das unidades de β -Galp, quando comparado com AG-OR (Figura 12B).

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE AG, AG-CR, AG-OR E AG-OR2.

Monossacarídeo	mol %			
	AG	⁽²⁾ AG-CR	⁽³⁾ AG-OR	⁽⁴⁾ AG-OR2
Ramnose	4	4	-	-
Arabinose	42	42	3	-
Galactose	41	47	97	100
Glucose	2	2	-	-
4-O-Metil-Glucose	-	5	-	-
⁽¹⁾ Ácido urônico	11	-	-	-

NOTAS: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. (1) determinação de ácidos urônicos segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); (2) AG carboxi-reduzido; (3) Polissacarídeo obtido após um processo de degradação controlada de Smith realizado sobre AG; (4) Polissacarídeo obtido após dois processos de degradação controlada de Smith realizados sobre AG.

TABELA 3 – PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE AG, AG-CR, AG-OR E AG-OR2.

Derivado Metilado	Ligações	⁽¹⁾ t_R	mol %			
			⁽²⁾ AG	⁽³⁾ AG-CR	⁽⁴⁾ AG-OR	⁽⁵⁾ AG-OR2
2,3,5-Me ₃ -Ara	terminal	0.834	21.5	20	3	-
3,4-Me ₂ -Rha	→)2-	0.967	-	1	-	-
2,5-Me ₂ -Ara	→)3-	0.973	6	5.5	-	-
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	terminal	1.000	-	5	-	-
2,3-Me ₂ -Ara	→)5-	1.025	14.5	12	-	-
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	terminal	1.039	2	4	19	20
3-Me-Rha	→)2,4-	1.172	-	3	-	-
2,4,6-Me ₃ -Gal	→)3-	1.242	7	6.5	24	63
2,3,6-Me ₃ -Gal	→)4-	1.268	-	5	-	-
2,3,6-Me ₃ -Glc	→)4-	1.291	2	2	-	-
2,3,4-Me ₃ -Gal	→)6-	1.411	3	4	29	3
2,4-Me ₂ -Gal	→)3,6-	1.824	33	32	25	14

NOTAS: (1) t_R = tempo de retenção relativo ao do 2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol; (2) o conteúdo de ácido urônico de AG foi 11%, e de AG-CR, AG-OR e AG-OR2 foi 0%, de acordo com o método de FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); (3) AG carboxi-reduzido; (4) Polissacarídeo obtido após um processo de degradação controlada de Smith realizado sobre AG; (5) Polissacarídeo obtido após dois processos de degradação controlada de Smith realizados sobre AG.

5.1.2.3. Caracterização estrutural de AG: discussão final

De acordo com os resultados apresentados, AG é uma arabinogalactana contendo uma cadeia principal de unidades de β -Galp (1 \rightarrow 3)-ligadas, substituídas em O-6 por cadeias laterais de β -Galp (1 \rightarrow 6)-ligadas. As cadeias laterais são substituídas em O-3 por cadeias de α -Araf (1 \rightarrow 5)- e (1 \rightarrow 3)-ligadas, e terminais não-redutores de α -Araf e 4-O-Me-GlcpA. Esta arabinogalactana encontra-se provavelmente ligada a uma RGI, por meio do C-4 de algumas unidades de Rha. Arabinogalactanas que apresentam uma cadeia principal formada por unidades de β -Galp (1 \rightarrow 3)-ligadas, substituídas em O-6 por cadeias laterais de β -Galp (1 \rightarrow 6)-ligadas, são denominadas arabinogalactanas do tipo II, enquanto as arabinogalactanas do tipo I apresentam uma cadeia principal formada por unidades de β -Galp (1 \rightarrow 4)-ligadas (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

As estruturas sugeridas de AG, RGI, AG-OR e AG-OR2 são mostradas na Figura 13.

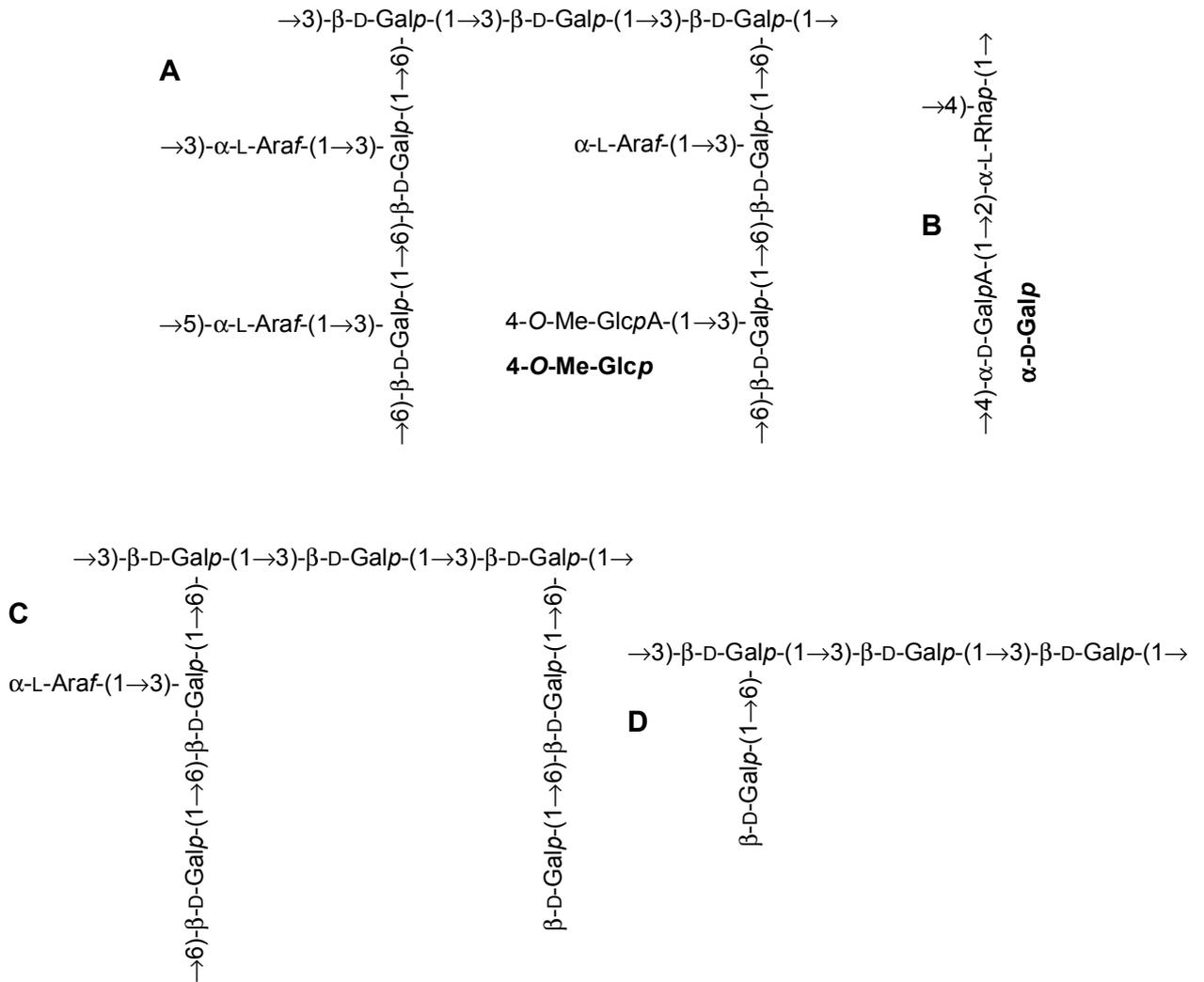


FIGURA 13 – Esquema das estruturas sugeridas para AG (A), RGI (B), AG-OR (C) e AG-OR2 (D). Em negrito são mostrados os monossacarídeos neutros obtidos após a carboxi-redução de AG.

5.2. POLISSACARÍDEO DA EXTRAÇÃO AQUOSA SOB REFLUXO

5.2.1. Extração e Purificação

Para a obtenção de outros polissacarídeos, folhas secas e moídas de *M. ilicifolia* (350 g) foram deslipidificadas com CHCl_3 -MeOH (2:1) e sofreram extração aquosa sob refluxo (Figura 14).

Os polissacarídeos, obtidos por precipitação com etanol (1,23 g%), foram fracionados pelo processo de congelamento e degelo, o qual resultou num precipitado. O material solúvel em água fria foi tratado com solução de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965) e o componente precipitado deste processo (PGA) apresentou um 1965[f0.5(9 em)36.(96)]ho1ogêne4.4(n-0.5(9so ana0.5(9sl.5(9 im)36.(9s dest)

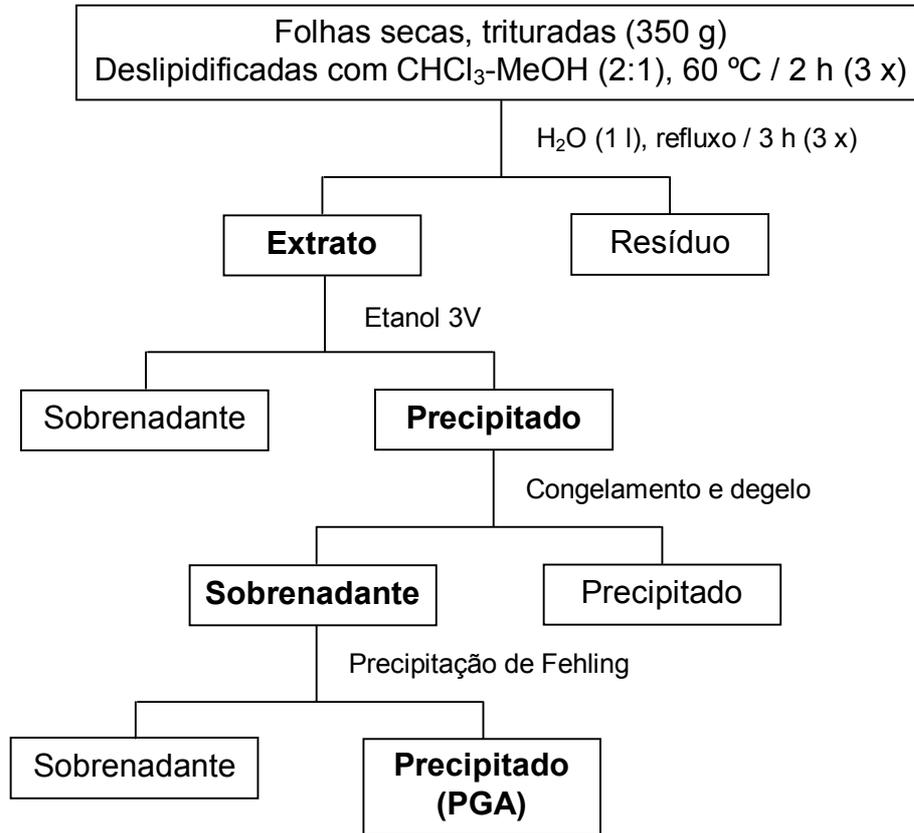


FIGURA 14 – Fluxograma do processo de extração e purificação do polissacarídeo PGA, obtido das folhas de *M. ilicifolia* por extração aquosa sob refluxo.

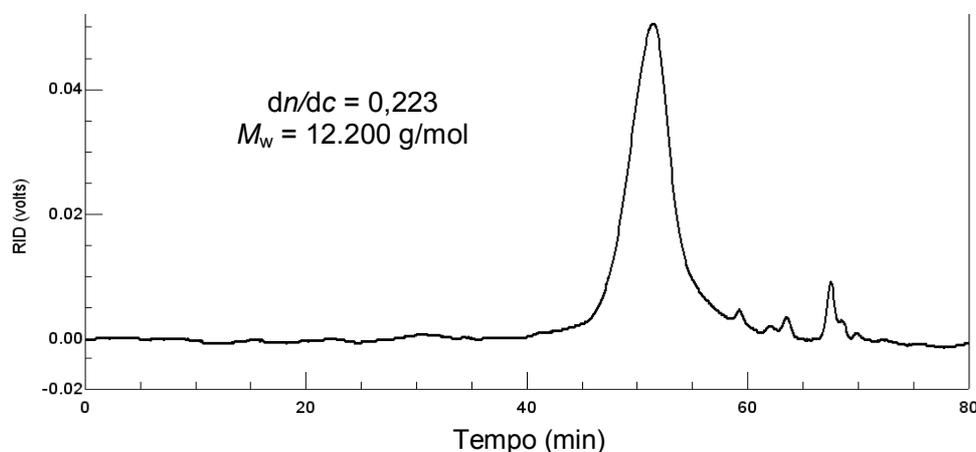


FIGURA 15 – Perfil de eluição do componente precipitado da precipitação de Fehling (PGA) em HPSEC.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA SOB REFLUXO DAS FOLHAS DE *Maytenus ilicifolia*.

Fração	⁽¹⁾ Rendimento		Monossacarídeos (%)						
	g	%	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	⁽²⁾ Ác
Ppt etanólico	4,3	1,23	3	19	1	1	13	7	56
Ppt C/D	0,3	0,01	2	16	6	8	12	52	4,0
Sob C/D	3,6	1,01	3	19	-	-	15	6	57
PGA (Ppt Feh)	1,1	0,30	-	traços	-	-	traços	-	100
Sob Feh	2,0	0,57	4	29	-	-	20	9	38

NOTAS: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Partindo de 350 g de folhas secas; (2) determinação de ácidos urônicos segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). Rha (ramnose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); Ác (ácido urônico); Ppt (precipitado); Sob (sobrenadante); C/D (congelamento e degelo); Feh (Fehling).

5.2.2. Caracterização Estrutural de PGA

O perfil homogêneo de eluição de PGA, em HPSEC (Figura 15), possibilitou o cálculo do seu dn/dc e da sua massa molar média (M_w), que corresponderam a 0,223 e 12.200 g/mol, respectivamente.

Conforme apresentado anteriormente, PGA é um polissacarídeo constituído apenas por unidades de ácidos urônicos. A estrutura desse ácido urônico foi, então, determinada após a carboxi-redução de PGA. O produto neutro (PGA-CR) continha apenas galactose em sua composição monossacarídica e a análise de metilação mostrou que estas unidades de galactose eram 4-O-substituídas, de acordo com a formação do derivado 2,3,6-Me₃-Gal. Isso mostrou que o ácido urônico presente em PGA é o ácido galacturônico e que este apresenta-se (1→4)-ligado.

O espectro de RMN-¹³C de PGA (Figura 16) apresentou apenas seis sinais, com aquele em δ 98,6 correspondendo ao C-1 de unidades de α -D-GalpA (RENARD et al., 1998). A substituição em O-4 foi confirmada pelo sinal em δ 78,0 e os sinais em δ 175,1, 71,3, 69,0 e 68,7 foram atribuídos ao C-6 ($-\underline{C}O_2H$), C-5, C-3 e C-2, respectivamente (RENARD et al., 1998).

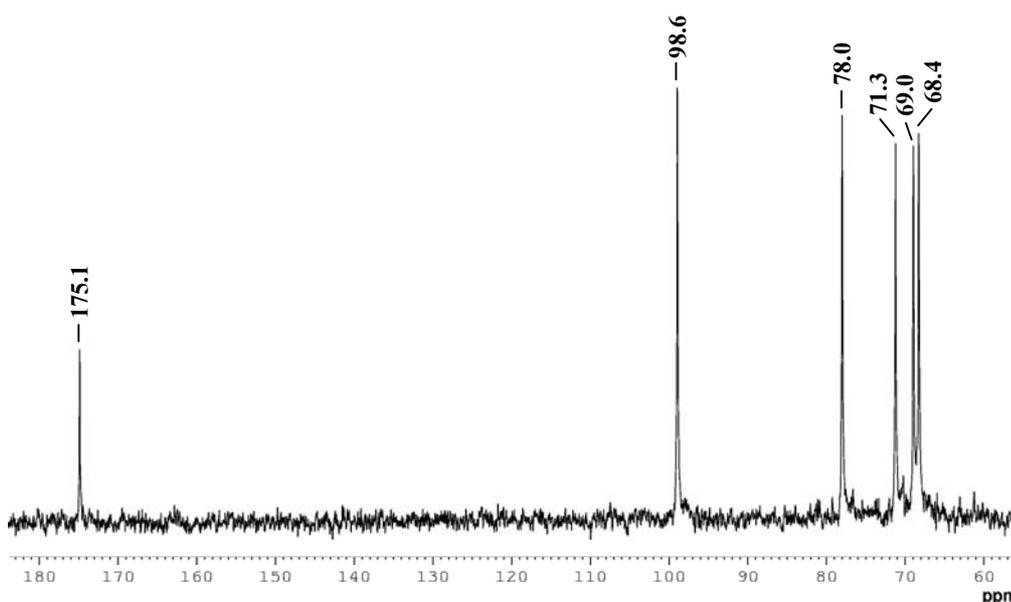


FIGURA 16 – Espectro de RMN-¹³C do polissacarídeo PGA. Experimento realizado em D₂O, a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

De acordo com os resultados obtidos, PGA é um polissacarídeo formado por unidades de α -D-GalpA (1 \rightarrow 4)-ligadas (Figura 17), denominado ácido poligalacturônico.

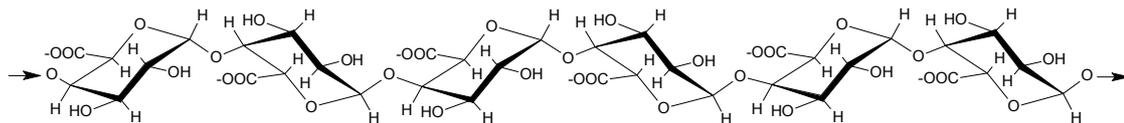


FIGURA 17 – Estrutura do polissacarídeo PGA, mostrando as unidades de α -D-GalpA ligadas por 1 \rightarrow 4.

5.3. POLISSACARÍDEO DA EXTRAÇÃO ALCALINA

5.3.1. Extração e Purificação

O material residual da extração aquosa foi submetido a extrações com KOH 2% e 10%, sucessivamente (Figura 18). Os extratos obtidos foram neutralizados e dialisados para a obtenção dos polissacarídeos, que renderam 20 e 3,7 g%, respectivamente. A partir da extração com KOH 2% foi previamente estudada, isolada e caracterizada uma arabinogalactana tipo I (CIPRIANI et al., 2004). Na Tabela 5 pode ser observado que Ara (48%) e Gal (11%) foram os principais monossacarídeos neutros desta fração (PBK2), indicando a presença da arabinogalactana.

O material obtido pela extração com KOH 10% (PBK10) foi fracionado pelo processo de congelamento e degelo, obtendo-se uma fração solúvel e outra insolúvel em água fria. O material insolúvel foi previamente analisado e a partir dele foi caracterizada uma homoxilana linear (CIPRIANI, 2003). O alto teor de xilose nesta fração (90%), observado na Tabela 5, indicou a presença da homoxilana.

A fração solúvel em água fria foi submetida à precipitação de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965) e a análise em HPSEC mostrou que o componente precipitado deste processo tinha um perfil homogêneo de eluição (Figura 19). O polissacarídeo purificado (HX) apresentou dn/dc de 0,165 e massa molar média (M_w) de 59.600 g/mol. Todo o processo de extração e purificação de HX pode ser observado na Figura 18.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS EXTRATOS ALCALINOS E DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO COM KOH 10% DAS FOLHAS DE *Maytenus ilicifolia*.

Fração	⁽¹⁾ Rendimento		Monossacarídeos (%)						
	g	%	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	⁽²⁾ Ác
PBK2	70,0	20,0	8	48	-	1	11	2	30
PBK10	13,0	3,71	2	10	60	-	7	9	12
Ppt C/D	6,9	1,97	-	3	90	-	3	4	-
Sob C/D	5,8	1,66	3	14	38	-	11	17	17
HX (Ppt Feh)	3,3	0,94	-	-	76	-	5	10	9
Sob Feh	2,1	0,60	5	24	16	-	14	21	20

NOTAS: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Partindo de 350 g de folhas secas; (2) determinação de ácidos urônicos segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). PBK2 e PBK10 (polissacarídeos brutos obtidos com KOH 2 e 10%, respectivamente); Rha (ramnose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); Ác (ácido urônico); Ppt (precipitado); Sob (sobrenadante); C/D (congelamento e degelo); Feh (Fehling).

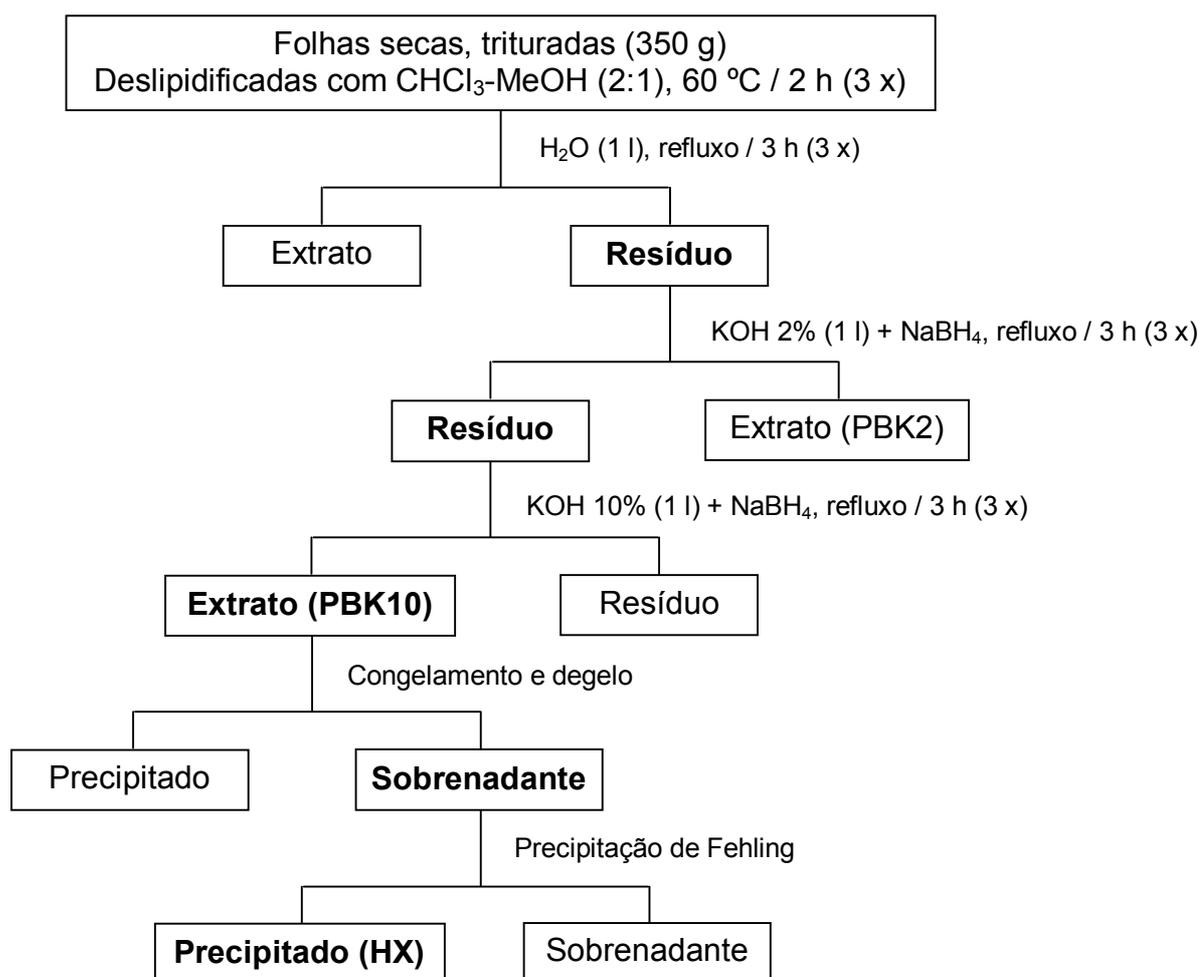


FIGURA 18 – Fluxograma do processo de extração e purificação do polissacarídeo

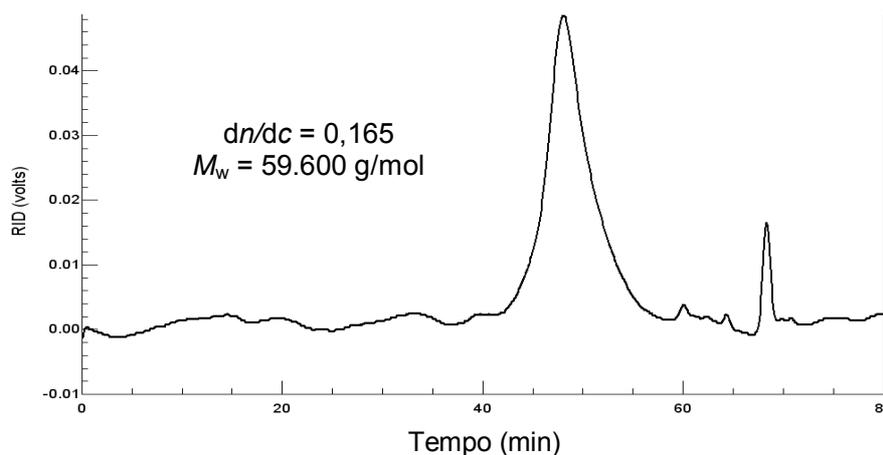


FIGURA 19 – Perfil de eluição do polissacarídeo HX em HPSEC.

5.3.2. Caracterização Estrutural de HX

A análise da composição monossacarídica mostrou que HX continha xilose, galactose, glucose e ácido urônico numa proporção molar de 76:5:10:9 (Tabelas 5 e 6), demonstrando que este polissacarídeo é uma heteroxilana ácida.

A estrutura do ácido urônico presente em HX foi determinada após sua carboxi-redução. O produto neutro (HX-CR) apresentou xilose, galactose, glucose, e 4-O-metilglucose numa proporção molar de 76:6:9:9 (Tabela 6). A presença do 4-O-metilglucitol acetato (m/z 87, 98, 129, 163 e 189) foi confirmada em análise de GC-MS, quando NaBD_4 foi usado na etapa de redução do preparo dos derivados acetatos de alditóis. Isso indicou que unidades de ácido 4-O-metilglucurônico estavam presentes em HX.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO POLISSACARÍDEO HX E DO POLISSACARÍDEO HX CARBOXI-REDUZIDO (HX-CR).

NOTAS: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. (1) determinação de ácidos urônicos segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991).

A análise de metilação foi realizada com HX-CR (Tabela 7), pois o polissacarídeo carboxi-reduzido mostra dados de GC-MS mais significativos, resultantes da análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados, uma vez que a análise não é prejudicada pela presença dos

TABELA 7 – PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO HX E DO POLISSACARÍDEO HX CARBOXI-REDUZIDO (HX-CR).

Derivado Metilado	Ligações	⁽¹⁾ t_R	mol %	
			⁽²⁾ HX	HX-CR
2,3,4-Me ₃ -Xyl	terminal	0,843	4	3
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	terminal	1,000	-	8
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	terminal	1,060	5	5
2,3-Me ₂ -Xyl	→)4-	1,090	64	66
3,4,6-Me ₃ -Glc	→)2-	1,295	-	3
3-Me-Xyl	→)2,4-	1,412	10	8
2,3-Me ₂ -Glc	→)4,6-	2,070	8	7

NOTAS: (1) t_R = tempo de retenção relativo ao do 2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucitol; (2) o conteúdo de ácido urônico de HX foi 9% e de HX-CR 0%, de acordo com o método de FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991).

O espectro de RMN-¹³C de HX (Figura 20) apresentou seis sinais na região de carbono anomérico entre δ 97,9 e 104,2. Os sinais em δ 101,6 e 101,1 foram atribuídos ao C-1 das unidades de β -D-Xylp 4-*O*- e 2,4-di-*O*-substituídas, respectivamente (MAURER-MENESTRINA et al., 2003; MELLINGER et al., 2005a), enquanto aquele em δ 104,2 foi dos terminais não-redutores de β -D-Galp (MELLINGER et al., 2005a; GORIN e MAZUREK, 1975), e outro em δ 97,9 correspondeu ao C-1 dos terminais não-redutores de 4-*O*-Me- α -D-GlcpA (MAURER-MENESTRINA et al., 2003; MELLINGER et al., 2005a). Os sinais em δ 76,4, 73,8, 72,7 e 63,0 foram atribuídos ao C-4, C-3, C-2 e C-5 das unidades de β -D-Xylp (1→4)-ligadas (MAURER-MENESTRINA et al., 2003; MELLINGER et al., 2005a; CARBONERO et al., 2002). Aqueles em δ 81,6 e 59,5 corresponderam ao $-\underline{\text{C}}\text{HOCH}_3$ -4 e $-\text{CHO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -4 das unidades de 4-*O*-Me- α -D-GlcpA, respectivamente (MAURER-MENESTRINA et al., 2003; MELLINGER et al., 2005a).

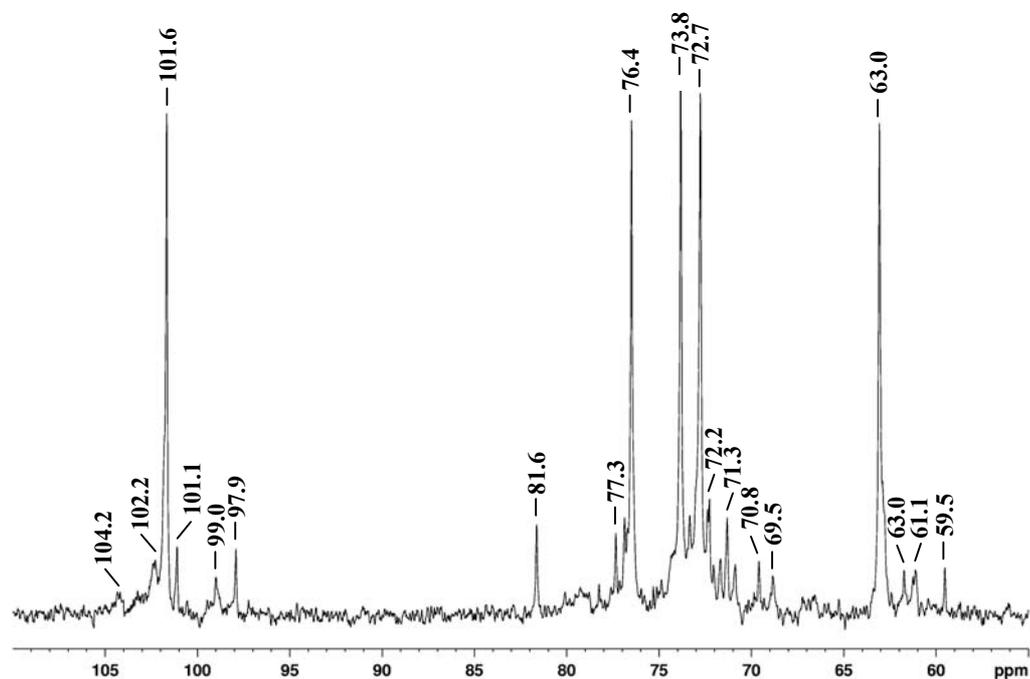


FIGURA 20 – Espectro de RMN-¹³C do polissacarídeo HX. Experimento realizado em D₂O, a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

De acordo com os resultados obtidos, o polissacarídeo HX é uma heteroxilana contendo uma cadeia principal constituída por unidades de β-D-Xylp (1→4)-ligadas, como mostrado na Figura 21.

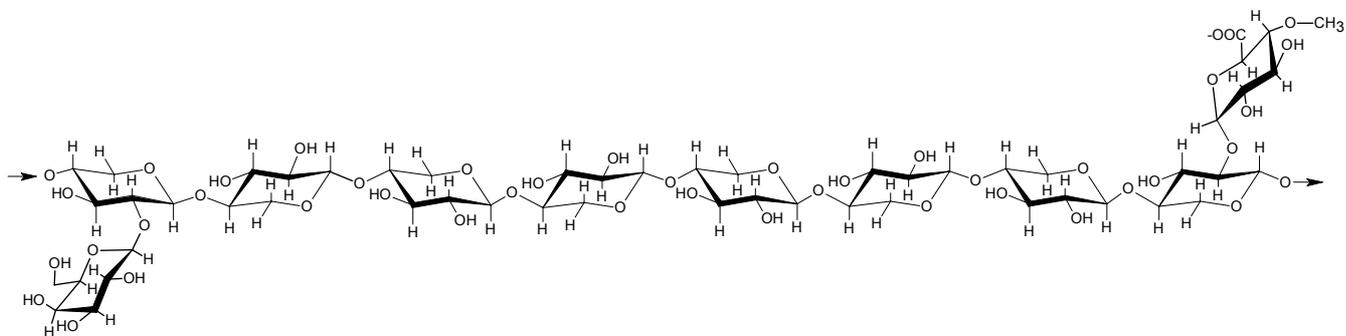


FIGURA 21 – Estrutura proposta do polissacarídeo HX, mostrando a cadeia principal de unidades de β-D-Xylp ligadas por 1→4 e os terminais não redutores de 4-O-Me-GlcpA e Galp.

5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE AG, PGA E HX

M. ilicifolia é amplamente usada na medicina popular para o tratamento de gastrite e úlcera gástrica. Embora a maior parte das atividades biológicas das plantas medicinais seja atribuída aos metabólitos secundários, foi demonstrado que polissacarídeos de plantas apresentam propriedade antiúlcera gástrica (SANMUGAPRIYA e VENKATARAMAN, 2007; NERGARD et al., 2005; YE et al., 2003; CHO et al., 2000; YAMADA, 1994; SUN et al., 1992a; SUN et al., 1992b).

O infuso das folhas de *M. ilicifolia* é capaz de extrair aproximadamente 1,3% de polissacarídeos em relação à massa total de folhas secas usadas para o preparo do chá (Figura 9 e Tabela 1). O principal polissacarídeo obtido, caracterizado como sendo uma arabinogalactana do tipo II (AG), é, então, ingerido quando o chá é bebido. Com o objetivo de determinar se as propriedades biológicas da *M. ilicifolia* poderiam ser devidas, pelo menos em parte, aos seus polissacarídeos, a atividade antiúlcera do polissacarídeo AG, e também dos polissacarídeos PGA e HX, foi avaliada.

Pré-tratamentos, por via oral, com AG, PGA e HX significativamente reduziram a ocorrência de lesão gástrica induzida por etanol (Figura 22), sugerindo uma habilidade potencial de estes polissacarídeos atuarem como agentes citoprotetores diretos. O pré-tratamento com AG na dose de 30 mg/kg reduziu os danos gástricos induzidos por etanol em 81%, com uma DE_{50} de 9,3 mg/kg (controle = $47,5 \pm 4,7$, média \pm erro médio padrão). PGA e HX também apresentaram atividade gastroprotetora, mas com doses efetivas maiores do que AG. Doses de 100 mg/kg de PGA e HX reduziram as lesões gástricas em 48% e 65%, respectivamente, com DE_{50} de 103 e 40 mg/kg (controle = 72 ± 7 , média \pm erro médio padrão). A ação protetora de AG contra lesões gástricas provocadas por etanol pode ser visualizada na Figura 23.

Os polissacarídeos descritos diferem estruturalmente e também nos seus potenciais de atividade antiúlcera, sugerindo que esta atividade é influenciada pela estrutura do polissacarídeo.

Possíveis mecanismos para o efeito antiúlcera são: a habilidade destes polímeros de se ligar à superfície da mucosa gástrica, funcionando como uma camada protetora; atividade anti-secretora de suco gástrico; proteção da mucosa

pelo aumento da síntese de muco; e seqüestro de radicais livres (NERGARD et al., 2005; YAMADA, 1994; MATSUMOTO et al., 1993).

AG é liberado por infusão, um procedimento brando usado na medicina popular. Assim, quando o chá de *M. ilicifolia* obtido por infusão é consumido, este polissacarídeo, entre outros compostos, é ingerido. PGA, apesar de ser obtido por extração aquosa sob refluxo, deve ser liberado em quantidades muito pequenas pelo processo de infusão. PGA corresponde ao componente precipitado da precipitação de Fehling (Ppt Feh) obtido pelo fracionamento dos polissacarídeos extraídos com água sob refluxo (Figura 14 e Tabela 4). A sua fração correspondente no infuso (Ppt Feh), apresentou rendimento muito baixo (0,01%), além de conter apenas 9% de ácidos urônicos em sua composição monossacarídica (Tabela 1).

A heteroxilana HX é obtida apenas por extração alcalina. Apesar disso, o estudo deste tipo de molécula é relevante, visto que as xilanas formam a maior classe de polissacarídeos encontrados em plantas superiores após a celulose (ASPINALL, 1980), e a solução alcalina necessária para sua extração pode ser facilmente removida para torná-las adequadas ao consumo.

O processo de obtenção dos extratos de *M. ilicifolia*, para a produção de fitoterápicos, é baseado na maceração hidro-alcoólica das folhas. Por este processo, é obtido um extrato rico em metabólitos secundários solúveis em álcool. Contudo, os metabólitos primários, tais como os polissacarídeos, não são extraídos. Nossos resultados mostraram que polissacarídeos podem ter um importante papel no efeito antiúlcera gástrica da *M. ilicifolia*. Dessa forma, o resíduo do processo industrial de maceração hidro-alcoólica poderia ser usado para a obtenção destes polissacarídeos, o que poderia conduzir a um aumento do valor comercial e medicinal da planta.

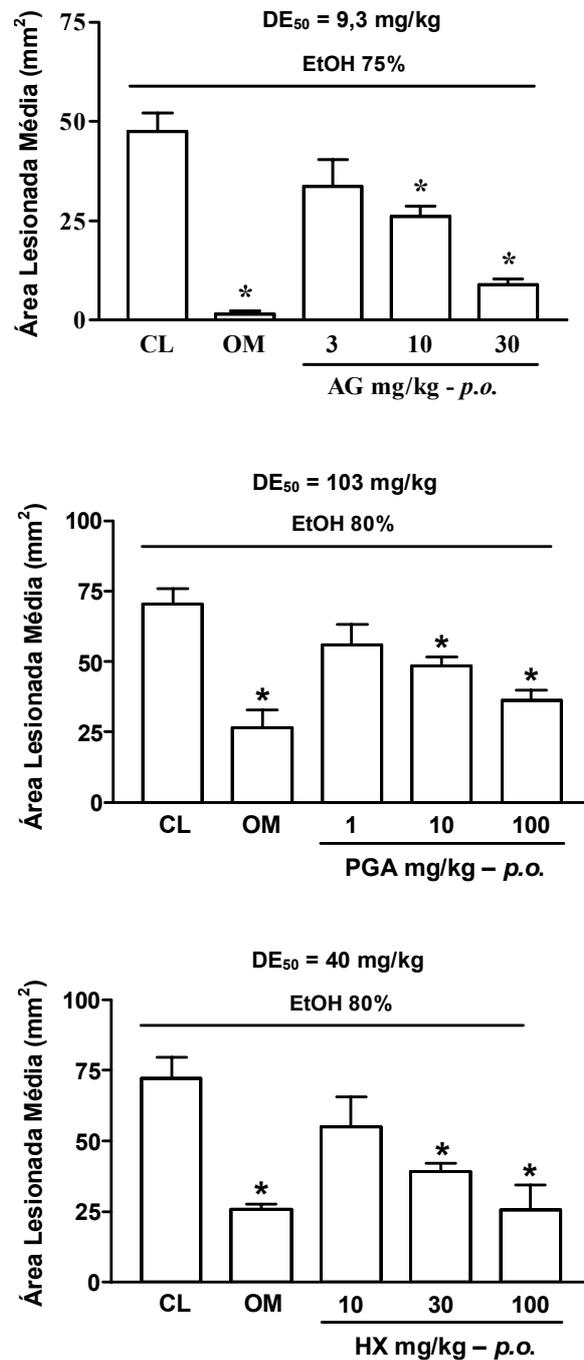


FIGURA 22 – Efeito protetor de AG (3, 10 e 30 mg/kg, *p.o.*), PGA (1, 10 e 100 mg/kg, *p.o.*) e HX (10, 30, e 100 mg/kg, *p.o.*) contra lesões gástricas induzidas por EtOH (CL: controle, H₂O 0,1 ml/100 g, *p.o.* e OM: omeprazol 40 mg/kg, *p.o.*). Os resultados são expressos como média \pm erro médio padrão ($n = 6$). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

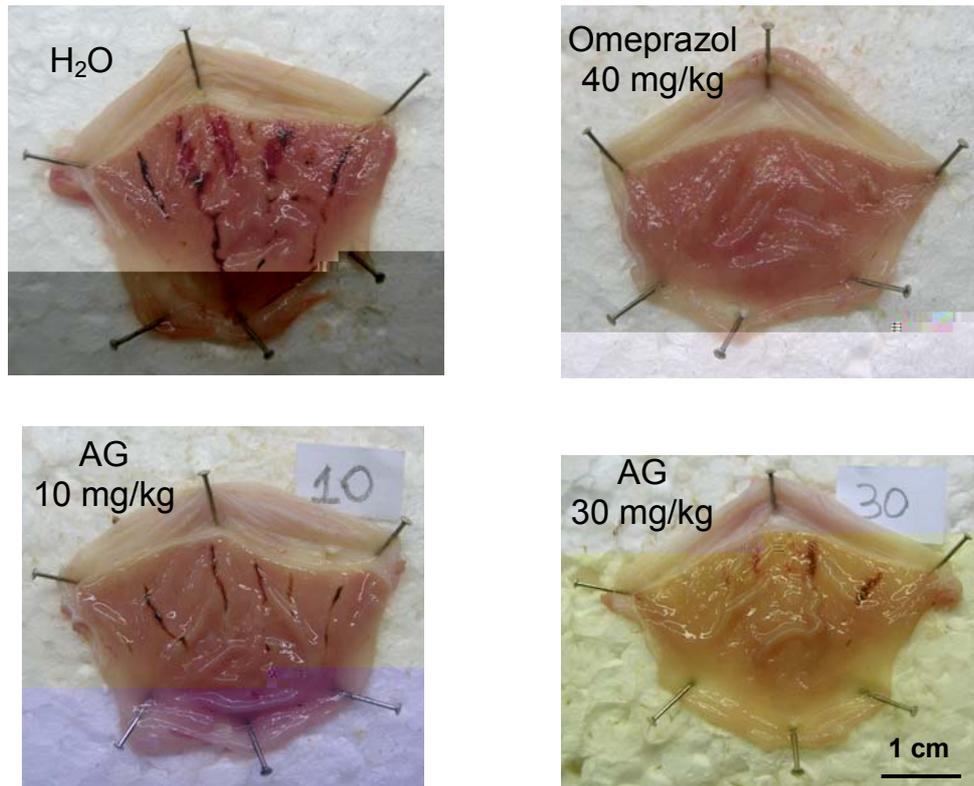


FIGURA 23 – Efeito protetor de AG (10 e 30 mg/kg, *p.o.*), contra lesões gástricas induzidas por EtOH (CL: controle, H₂O 0,1 ml/100 g, *p.o.* e OM: omeprazol 40 mg/kg, *p.o.*).

5.4.1. Atividade Antiúlcera de Polissacarídeos Semelhantes à AG, PGA e HX

Polissacarídeos pertencentes às mesmas classes de AG e PGA já foram avaliados com relação à atividade antiúlcera gástrica. NERGARD et al. (2005), estudando a planta *Cochlospermum tinctorium*, relacionaram a atividade antiúlcera de um extrato bruto, rico em polissacarídeos, à presença de arabinogalactana tipo II péctica. O extrato reduziu as lesões gástricas em 55% numa concentração de 100 mg/kg, sendo consideravelmente menos eficiente que a arabinogalactana tipo II (AG) de *M. ilicifolia*, que na concentração de 30 mg/kg reduziu as lesões em 81% (Figura 22). Dentre os polissacarídeos relacionados com o efeito antiúlcera gástrica descritos até o momento, AG foi o que apresentou maior eficácia.

YAMADA (1994) avaliou o efeito antiúlcera de um polissacarídeo purificado da planta *Bupleurum falcatum*, contendo 93,6% de ácido galacturônico. Este polissacarídeo (bupleuran 2IIc) é formado por três porções distintas: um núcleo constituído por ácido poligalacturônico, correspondendo a aproximadamente 86% da molécula; uma região constituída por ramnogalacturonana I, ramificada por cadeias laterais formadas por unidades de monossacarídeos neutros, principalmente galactose; e uma região constituída por ramnogalacturonana II. Bupleuran 2IIc na dose de 100 mg/kg reduziu as lesões gástricas em 74%. O ácido poligalacturônico (PGA) de *M. ilicifolia* que, na mesma dose, reduziu as lesões em apenas 48%. YAMADA (1994) avaliou também a atividade antiúlcera do ácido poligalacturônico de laranja, que apresentou atividade significativa, porém menor que a do polissacarídeo bupleuran 2IIc, concluindo que não apenas a região constituída por ácido poligalacturônico, mas também a outras porções da molécula de bupleuran 2IIc são importantes para a atividade antiúlcera. Dessa forma, apesar de bupleuran 2IIc e PGA apresentarem estruturas semelhantes, as regiões distintas do polissacarídeo bupleuran 2IIc parecem ser importantes para a sua maior atividade, demonstrando, novamente, que a atividade antiúlcera gástrica é influenciada pela estrutura do polissacarídeo.

Com relação à heteroxilana (HX), não existem trabalhos envolvendo atividade antiúlcera descritos para esta classe de polissacarídeos. Sendo HX uma hemicelulose, conclui-se que não apenas polissacarídeos pécticos podem apresentar efeito antiúlcera gástrica.

5.5. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO VASORRELAXANTE

Folhas secas e moídas de *M. ilicifolia* (118 g) sofreram extração com clorofórmio-metanol (2:1 v/v), metanol-água (4:1 v/v) e água, sucessivamente (Figura 24). O extrato aquoso foi tratado com etanol, fornecendo um precipitado e um sobrenadante etanólico (ES; 1,7 g%). ES teve seu efeito vasorrelaxante avaliado por RATTMANN (2004), e apresentou 100% de vasorrelaxamento em uma concentração de 300 µg/ml, com uma CE_{50} de 199,7 µg/ml (Figura 25 A).

Com o objetivo de identificar o composto responsável pela atividade vasorrelaxante, ES (1g) foi particionado entre água e acetato de etila (Figura 24), na tentativa de concentrar o composto vasoativo em uma das frações resultantes. A fração solúvel em água foi denominada F_{H_2O} (560 mg) e a solúvel em acetato de etila, F_{EtOAc} (170 mg). A análise da atividade vasorrelaxante mostrou que o composto vasoativo foi concentrado na fração F_{EtOAc} , que mostrou praticamente 100% de vasorrelaxamento numa concentração de 50 µg/ml, enquanto a fração F_{H_2O} não mostrou atividade em concentrações de até 100 µg/ml (Figura 25 B).

Para a obtenção de uma fração que apresentasse uma alta atividade vasorrelaxante, o que corresponderia a uma alta concentração do composto vasoativo, o procedimento seguinte a ser adotado seria o fracionamento de F_{EtOAc} por cromatografia em coluna de sílica gel. No entanto, ela não foi realizada. Durante o processo de solubilização de F_{EtOAc} em um pequeno volume de acetato de etila (20 mL), para a posterior aplicação na coluna cromatográfica, parte do material permaneceu insolúvel e foi separado por centrifugação, originando a fração F_{INS} (64 mg). A fração solúvel em pequeno volume de acetato de etila foi denominada F_{SOL} . A análise da atividade mostrou que tanto F_{INS} quanto F_{SOL} apresentaram efeito vasorrelaxante, mas a fração F_{INS} foi a mais potente, mostrando 100% de vasorrelaxamento numa concentração de 10 µg/ml, com uma CE_{50} de 4,3 µg/ml (Figura 25 B).

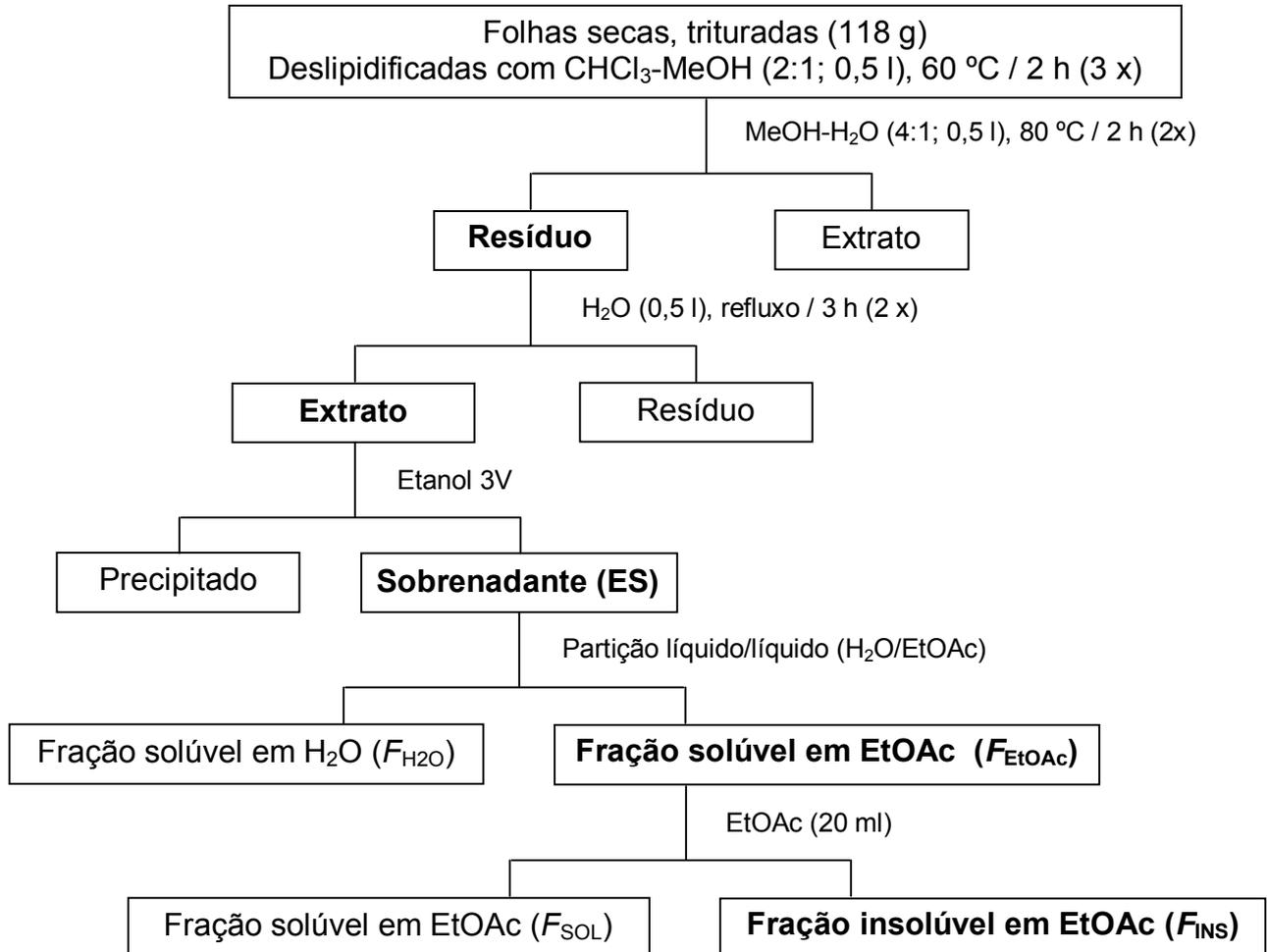


FIGURA 24 – Fluxograma do processo de extração e fracionamento de ES, fração que teve a atividade vasorrelaxante investigada por RATTMANN (2004).

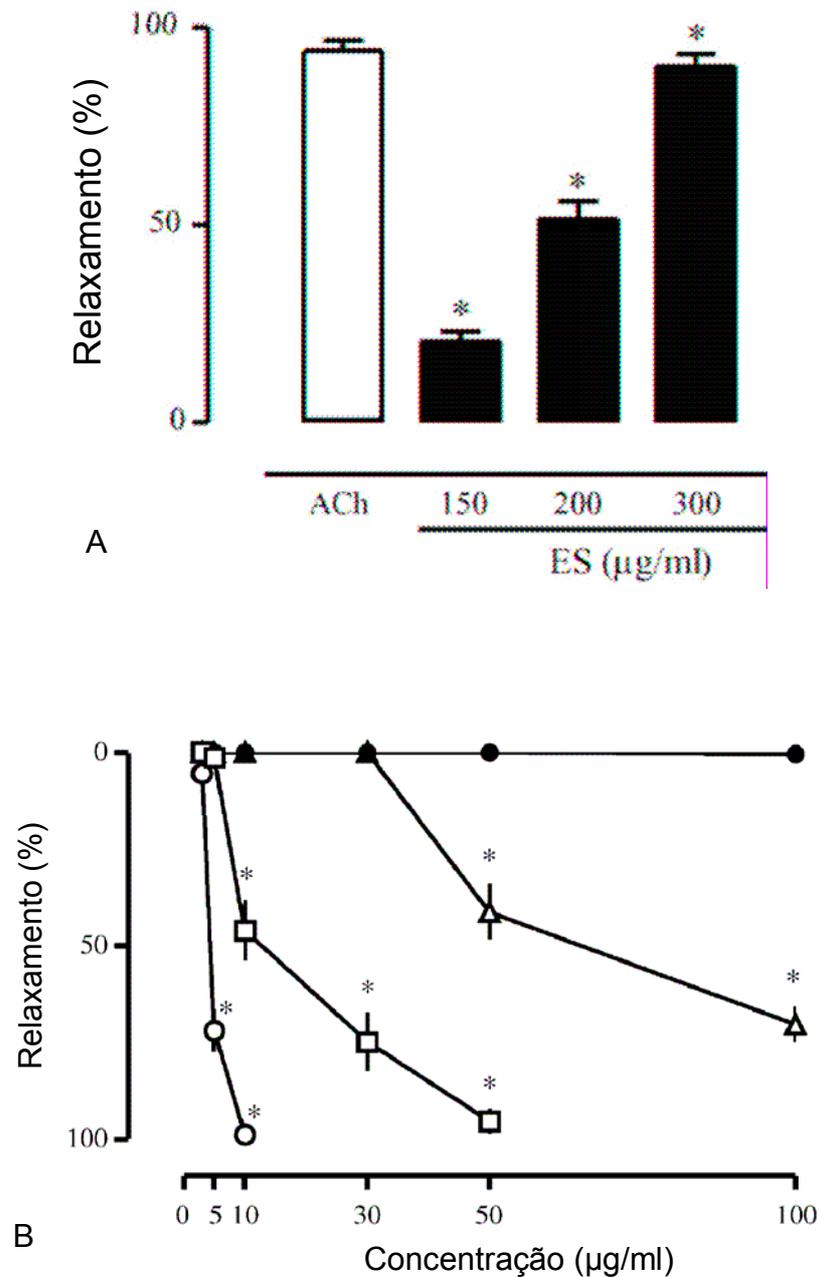


FIGURA 25 – Avaliação do efeito vasorrelaxante sobre anéis de aorta de ratos, previamente contraídos por incubação com fenilefrina (1 μ M). (A) Atividade relaxante de ES (150, 200 e 300 μ g/ml). Acetilcolina (ACh; 1 μ M) é usada como controle positivo; (B) Atividade relaxante das frações F_{H_2O} (círculos pintados), F_{EtOAc} (quadrados), F_{SOL} (triângulos) e F_{INS} (círculos) nas concentrações de 3, 5, 10, 30, 50 e 100 μ g/ml. Os resultados mostram a média \pm erro médio padrão (n = 6). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste-t sujeito à correção de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao máximo de contração induzida por fenilefrina (1 μ M).

5.5.1. Avaliação Estrutural do Composto Vasoativo

A fração F_{INS} , por ter apresentado o maior efeito vasorrelaxante, foi analisada por RMN- ^{13}C (Figura 26), o qual mostrou sinais típicos da presença de catequinas. Os sinais em δ 144,1, 144,2 e 130,1 correspondem às hidroxilas vicinais e ao carbono substituído do grupamento catecol. A presença de sinais em δ 77,5, 64,4, 155,7 e 155,9 foi atribuída a carbonos característicos do anel flavan. As estruturas químicas da catequina e do seu isômero epicatequina são mostradas na Figura 27 e os deslocamentos químicos de ^{13}C , de acordo com BREITMEIER e WOLTER (1990), são apresentados na Tabela 8.

LORENZ et al. (2004) descreveram efeito vasorrelaxante para epigalocatequina-3-galato, obtida do chá verde. A atividade foi relacionada à ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial. A ação vasorrelaxante provocada por ES também é dependente de óxido nítrico (RATTMANN, 2004). Dessa forma, a presença de sinais típicos de catequina na fração F_{INS} sugere que uma molécula relacionada à catequina pode estar envolvida com o efeito vasorrelaxante.

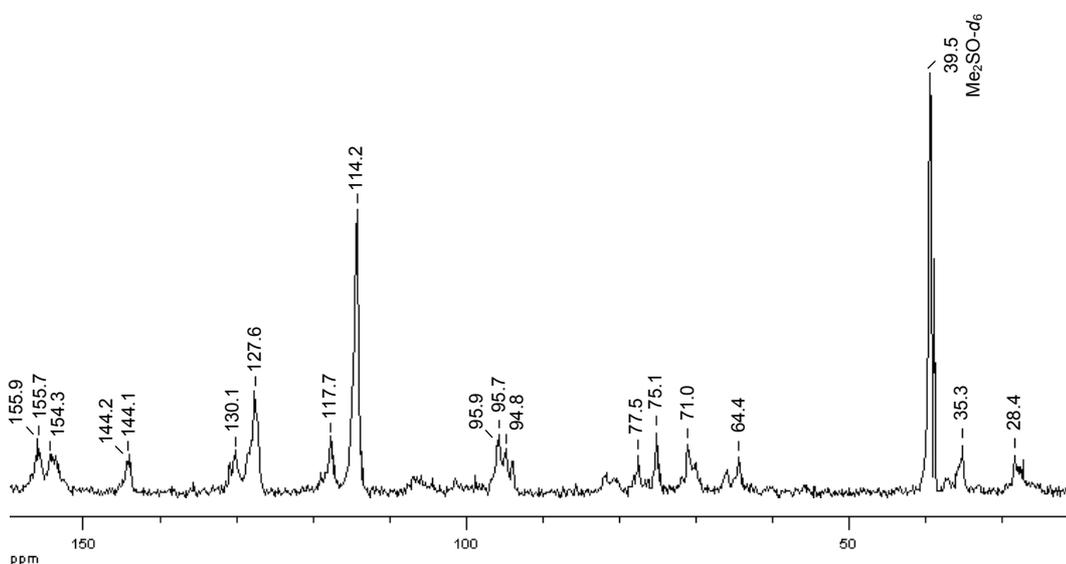


FIGURA 26 – Espectro de RMN- ^{13}C da fração F_{INS} , obtida após fracionamento de ES. Experimento realizado em Me₂SO-d₆, a 40 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

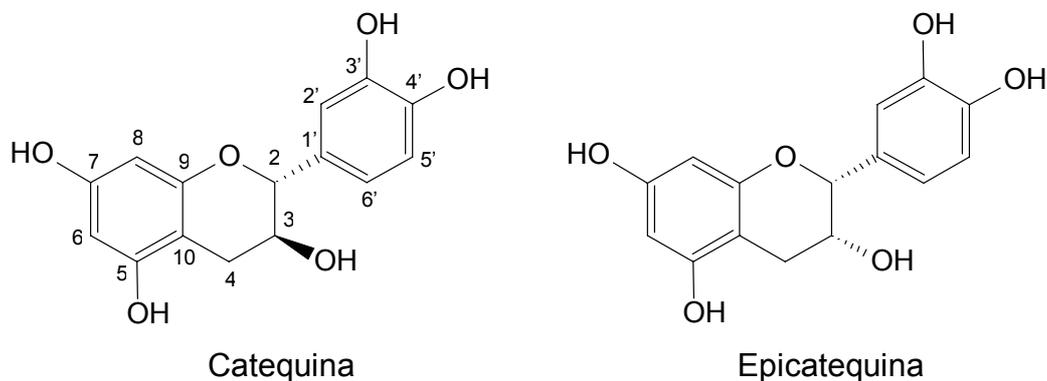


FIGURA 27 – Estruturas químicas da catequina e epicatequina.

TABELA 8 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C (PPM) PARA EPICATEQUINA EM $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$.

C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
78,1	65,1	28,0	156,0	95,6	156,3	94,5	155,7	98,8	130,7	118,1	144,4	144,5	115,0	118,1

FONTE: BREITMAIER e WOLTER (1990).

5.5.2. Quantificação de Catequina na Fração ES

De acordo com o resultado de RMN- ^{13}C obtido para a fração F_{INS} , é provável que o composto vasoativo seja uma catequina ou um derivado desta. Análise em GC-MS mostrou a presença de catequina e do seu isômero epicatequina na fração ES trimetilsililada (TMS) (Figura 28). Esses dois compostos também foram observados por HPLC (Figura 29), no qual foram quantificados. Catequina e epicatequina representaram 1,6 e 1,7% do peso seco de ES, respectivamente.

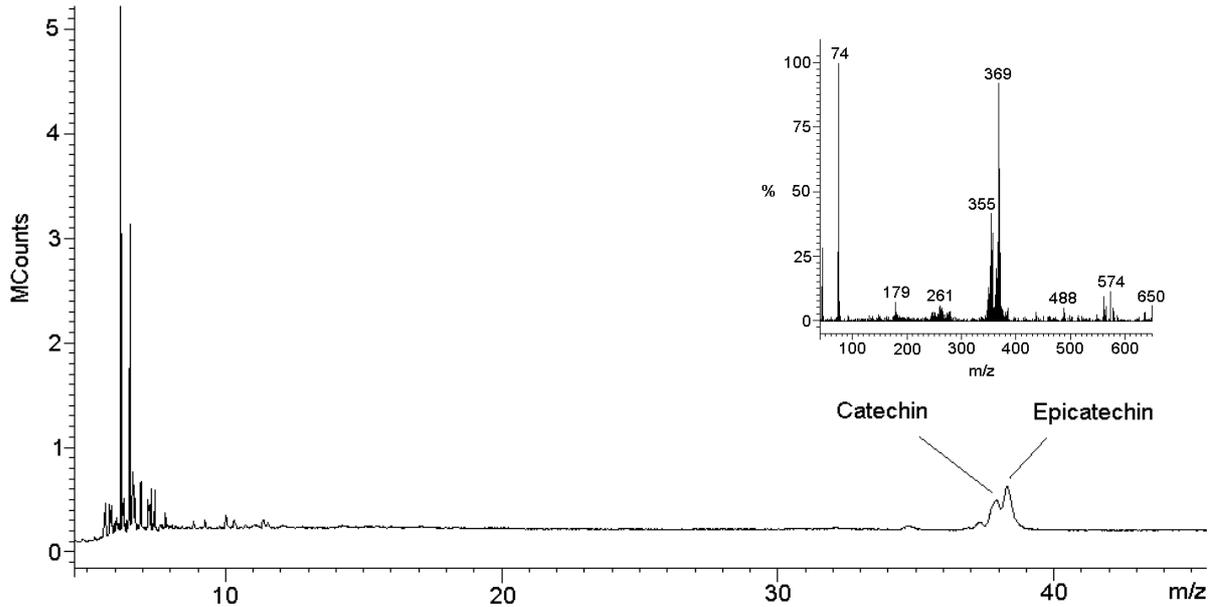


FIGURA 28 – Análise de GC-MS da fração ES trimetilsililada (TMS). Espectro de massa da catequina-TMS e epicatequina-TMS é mostrado.

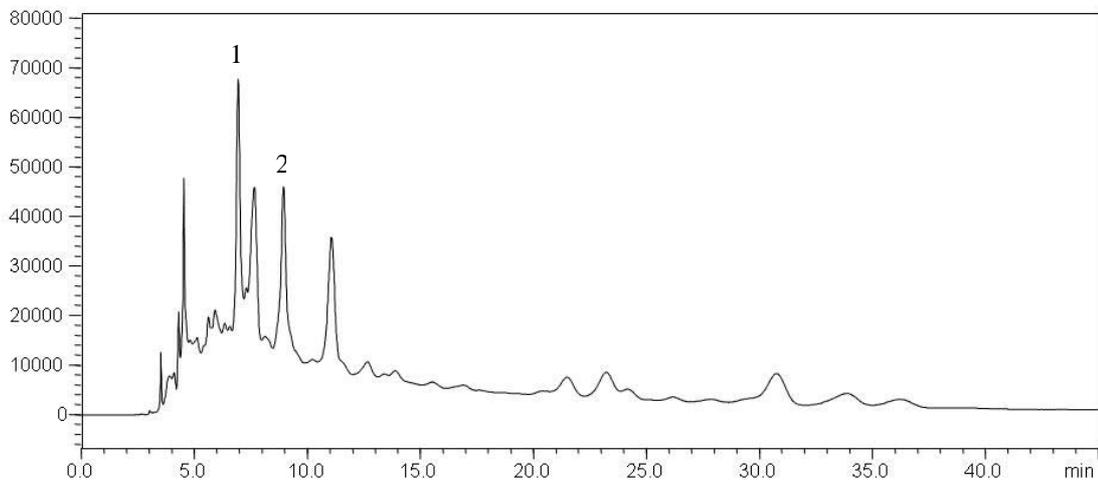


FIGURA 29 – Perfil de eluição da fração ES em HPLC com detecção em 280 nm. (1) (+)-catequina; (2) (-)-epicatequina.

Embora o composto responsável pelo efeito vasorrelaxante ainda não tenha sido identificado, estes resultados sugerem que algum composto relacionado à catequina, presente em ES e concentrado em F_{INS} , pode estar envolvido com a atividade.

6. CONCLUSÕES

- O chá de *M. ilicifolia* obtido pelo processo de infusão apresenta 1,27 g% de polissacarídeos, sendo o principal uma arabinogalactana do tipo II (AG) de estrutura complexa. Esta arabinogalactana apresenta propriedade antiúlcera gástrica com DE_{50} de 9,3 mg/kg, indicando que ela pode ter um papel importante no efeito biológico do infuso de *M. ilicifolia*.
- Outros polissacarídeos presentes nas folhas da *M. ilicifolia*, caracterizados como ácido poligalacturônico (PGA) e heteroxilana (HX), também apresentaram propriedade antiúlcera gástrica com DE_{50} de 103 e 40 mg/kg, respectivamente. Estes polissacarídeos são obtidos por processos mais drásticos que a infusão: extração aquosa sob refluxo e extração alcalina, respectivamente. Dessa forma, a planta apresenta outros componentes ativos além daqueles que são ingeridos com o consumo do infuso.
- Os polissacarídeos descritos apresentaram eficácias distintas contra úlcera gástrica induzida por etanol, sugerindo que a ação antiúlcera é influenciada pela estrutura do polissacarídeo.
- Os processos industriais de obtenção de extratos para a produção de fitoterápicos baseiam-se na maceração hidro-alcoólica das folhas da planta, o que não favorece a extração de polissacarídeos. Tendo estas moléculas demonstrado atividade antiúlcera, a propriedade medicinal dos fitoterápicos de *M. ilicifolia* poderia ser aumentada se o material residual da maceração fosse utilizado para a extração destes polissacarídeos.
- O processo de fracionamento do extrato com propriedade vasorrelaxante (ES), obtido de folhas de *M. ilicifolia*, gerou uma fração com alta atividade (F_{INS}), apresentando 100% de relaxamento numa concentração de 10 μ g/ml. A análise de RMN- ^{13}C desta fração sugeriu que algum composto relacionado à catequina poderia estar envolvido com a atividade vasorrelaxante.

REFERÊNCIAS

- ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. **Scientific American**, v. 232, p. 81-95, 1975.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, 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. **Progress in biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996. v. 14, p. 47-55.
- ASPINAL, G. O. In: **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1973. p. 95-115.
- ASPINAL, G. O. **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982. v. 1, 503p.
- ASPINAL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 473-500.
- ASPINAL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. New York, p. 429-430, 1959.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 143.
- BAUER, W. D.; TALMADGE, K. W.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, v. 51, p. 174-187, 1973.
- BOHN, J. A.; Be MILLER, J. N. 1→3 β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3-14, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução n. 89 de 16.03.04. **Diário Oficial da União** (Sessão 1) de 18.03.2004, p. 32-34.
- BREITMEIER, E.; VOELTER W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy: high resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry**. 3. ed. New York: VCH, 1990. p. 455.
- BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, 194p. 1990.
- CAPEK, P.; HRIBALOVÁ, V.; SVANDOVÁ, E.; EBRINGEROVÁ, A.; SASINKOVÁ, V., MASAROVÁ, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia*

officinalis L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 113-119, 2003.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN P. A. J.; IACOMINI M. A (1→6)-linked β -mannopyranan, pseudonigeran, and a (1→4)-linked β -xylan, isolated from the lichenised basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, p. 175-178, 2002.

CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME, 87p. 1988.

CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus sp* (espinheira-santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 21-35.

CARLINI, E. A.; FROCHTENGARTEN, M. L. Toxicologia clínica (fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 67-73.

CARLINI, E. A.; MACAUBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; BARBOSA, V. P. Toxicologia pré-clínica da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 49-66.

CARPITA, N. C. Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1089-1093, 1984.

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, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Courier, 2000. p. 52-108.

CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico**. Campinas, 1992. 253 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – UNICAMP.

CIPRIANI, T. R. **Extração, purificação e caracterização estrutural de polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa)**. Curitiba, 2003. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 703-706, 2004.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CHO, C. H.; MEI, Q. B.; SHANG, P.; LEE, S. S.; SO, H. L.; GUO, X. LI, Y. Study of the gastrointestinal protective effects of polysaccharides from *Angelica sinensis* in rats. **Planta Medica**, v. 66, p. 348-351, 2000.

D'ADAMO, P. A simple, inexpensive test to assess neutrophil activity via a myeloperoxidase-mediated candidal index. **Journal of Naturopathic Medicine**, v. 1, p. 68-71, 1990.

DAS, N. N.; DAS, S. C.; DUTT, A. S.; ROY, A. Lignin-xylan ester linkage in jute fiber. **Carbohydrate Research**, v. 94, p. 73-82, 1981.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudates: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 167-175, 1999.

DEY, P.M.; BROWNLEADER, M.D.; HARBORNE, J.B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 6-9.

DINAND, E.; VIGNON, M. R. Isolation and characterization of a (4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylan from sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 330, p. 285-288, 2001.

DONG, Q.; FANG, J. Structural elucidation of a new arabinogalactan from the leaves of *Nerium indicum*. **Carbohydrate Research**, v. 332, p. 109-114, 2001.

FALEIROS, I. C. F.; SANTOS, D. S.; HARA, C. M.; PEREIRA, A. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; FRANÇA, S. C. Efeito antiulcerogênico de frações hexânicas das folhas de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12., 1992, Curitiba. **Anais**. Curitiba: UFPR, 1992. Resumo 042.

FERREIRA, P. M.; OLIVEIRA, C. N.; OLIVEIRA, A. B.; LOPES, M. J.; ALZAMORA, F.; VIEIRA, M. A. R. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. **Planta**, v. 219, p. 319-324, 2004.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

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

FRANSEN, C. T. M.; HASELEY, S. R.; HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; KAMERLING, J. P.; Vliegenthart, J. F. G. Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 539-547, 2000.

GEOCZE, S.; VILELA, M. P.; CHAVES, B. D. R.; FERRARI, A. P.; CARLINI, E. A. Tratamento de pacientes portadores de dispepsia alta ou de úlcera péptica com preparações de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* "espinheira-santa" e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 75-87.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996. p. 665.

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

GREGORY, A. C. E.; O'CONNELL, A. P.; BOLWELL, G. P. Xylans. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Andover, v. 15, p. 439-455, 1998.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 357-360, 1965.

HEIJMEN, F. H.; DU PONT, J. S.; MIDDELKOOP, E.; KREIS, R. W.; HOEKSTRA, M. J. Cross-linking of dermal sheep collagen with tannic acid. **Biomaterials**, v. 18, p. 749-754, 1997.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Triterpenos from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3713-3716, 1991.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Journal of Chemistry Society, Chemistry Communications**, v. 48, p. 1-70, 1976.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 36-38, 1965.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93-100, 2004.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In: VISSER, J.; BELDEMAN, G.; SOMEREN, K. M. A.; VORAGEN, A. G. J. **Xylans and xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 1-15.

KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K. W.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. **Plant Physiology**, v. 51, p. 188-196, 1973.

KOMALAVILAS, P.; MORT, A. J. The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 261-272, 1989.

LAU, J. M.; McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. **Carbohydrate Research**, v. 137, p. 111-125, 1985.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

LORENZ, M.; WESSLER, S.; FOLLMANN, E.; MICHAELIS, W.; DÜSTERHÖFT, T.; BAUMANN, G.; STANGL, K.; STANGL, V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 6190-6195, 2004.

MACAUBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; FORMIGONI, M. L. O. S.; SILVEIRA FILHO, N. G.; CARLINI, E. A. Estudo da eventual ação antiúlcera gástrica do bálsamo (*Sedum sp*), folha-da-fortuna (*Bryophyllum calycinum*), couve (*Brassica oleraceae*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: CARLINI, E. L. A. **Programa de pesquisa de plantas medicinais: Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espinheira-santa” e outras)**. Brasília: CEME, 1988. p. 5-20.

MATSUMOTO, T.; MORIGUCHI, R.; YAMADA, H. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by hydrochloric acid/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 535-539, 1993.

MAURER-MENESTRINA, J.; SASSAKI, G. L.; SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of a highly substituted β -xylan of the gum exudate of the palm *Livistonia chinensis* (chinese fan). **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1843-1850, 2003.

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLINGER, C. G., CARBONERO, E. R., CIPRIANI, T. R., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. Xylans from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 129-132, 2005a.

MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; NOLETO, G. R.; CIPRIANI, T. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1479-1483, 2005b.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

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

OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; MACAÚBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 29-41, 1991.

PANIZZA, S.; ROCHA A. B.; GECCHI, R.; SOUZA-SILVA, R.; PENTEADO, R. *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius: teor em taninos na casca e sua propriedade cictrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 1 p. 101-10, 1988.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.

PRESCOTT, J. H.; ENRIQUEZ, P.; JUNG, C.; MENZ, E.; GROMAN, E. Larch arabinogalactan for hepatic drug delivery: isolation and characterization of a 9 kDa arabinogalactan fragment. **Carbohydrate Research**, v. 278, p. 113-128, 1995.

RATTMANN, Y. D. **Participação do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante de extratos e frações semi-purificadas da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek (espinha-santa)**. Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências – Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

REICHER, F. GORIN, P. A. J.; SIERAKOWSKI, M. R.; CORRÊA, J. B. C. Highly uneven distribution of O-acetyl groups in the acidic D- xylan of *Mimosa scabrella* (Bracatinga). **Carbohydrate Research**, v. 193, p. 23-31, 1989.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C. Lignin-hemicellulose complexes from the stem of *Mimosa bracatinga*, Hoehne. Na. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 54, p. 579-584, 1982.

REICHER, F.; CORREA, J. B. C.; GORIN, P. A. J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracatinga). A study of O-acetyl groups migration. **Carbohydrate Research**, v. 135, p. 129-140, 1984.

REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S.; RECHIA, C. V. G.; SIERAKOWSKI, M. R.; GORIN, P. A. J. Uneven O-acetyl distribution in a lightly acetylated D-xylan from sugar cane. **Ciência e Cultura**, v. 46, p. 283-285, 1994.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 205-236.

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 271-280, 1998.

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.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Technical Association of Pulp and Paper Industry**, v. 37, p. 336-343, 1954.

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

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SCHINDLER, T. M. **The view of primary cell wall**. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., v. 161, p. 499-508, 1998.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1675-1681, 1994.

SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Developmente and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 787-790, 2004.

SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 21-27, 1991.

SRIVASTAVA, R.; KULSHVESHTHA, D. K. Bioactive polysaccharides from plants, **Phytochemistry**, v. 28, p. 2877-2883, 1989.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**. Orlando: Academic Press, 1983. p. 97-193.

SUN, R. C.; FANG, J. M.; TOMKINSON, J.; GENG, Z. C.; LIU, J. C. Fractional isolation, physico-chemical characterization and homogeneous esterification of hemicelluloses from fast-growing poplar wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 29-39, 2001.

SUN, X. B., MATSUMOTO, M., YAMADA, H. Anti-ulcer activity and mode of action of the polysaccharide fraction from the leaves of *Panax ginseng*. **Planta Medica**, v. 58, p. 432-435, 1992a.

SUN, X. B., MATSUMOTO, M., YAMADA, H. Purification of an anti-ulcer polysaccharide from the leaves of *Panax ginseng*. **Planta Medica**, v. 58, p. 445-448, 1992b.

TALMADGE, K. W.; KEEGSTRA, K.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology**, v. 51, p. 158-173, 1973.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 151-158, 2002.

UEMG. Centro de Pesquisa (CEPE). **Espinheira Santa**. Disponível em: <<http://www.lavras.br/cepe/fotos/espinheira%20santa.htm>> Acesso em 23 out. 2001.

VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plant cell wall architecture. **Cell**, v. 56, p. 231-239, 1989.

VELLOSA, J. C.R.; KHALIL, N. M.; FORMENTON, V. A. F.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 243-244, 2006.

WHISTLER, R. L. **The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry**. London: Academic Press, 1970. p. 447-458.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 269-276, 1994.

YE, Y. N., SO, H. L., LIU, E. S. L., SHIN, V. Y., CHO, C. H. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. **Life Sciences**, v. 72, p. 925-932, 2003.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C., BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 219-231, 2005.

ZHU, N.; SHARAPIN, N.; ZHANG, J. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 265-268, 1998.

ANEXOS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)