

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARÍLIA LOCATELLI CORRÊA FERREIRA

POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS DE FOLHAS DE *Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS SOBRE CÉLULAS THP-1

CURITIBA  
2012

MARÍLIA LOCATELLI CORRÊA FERREIRA

POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS DE FOLHAS DE *Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS SOBRE CÉLULAS THP-1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto

CURITIBA  
2012

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Ferreira, Marília Corrêa Locatelli

Polissacarídeos solúveis de folhas de *Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris*: isolamento, caracterização e efeitos sobre células THP-1. /  
Marília Corrêa Locatelli Ferreira. – Curitiba, 2012.

136 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

Co-orientadora: Guilhermina Rodrigues Noletto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Artemísia 2. Polissacarídeos 3. Leucemia I. Título II. Petkowicz, Carmen Lúcia de Oliveira III. Noletto, Guilhermina, Rodrigues IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 616.99419  
574.192482

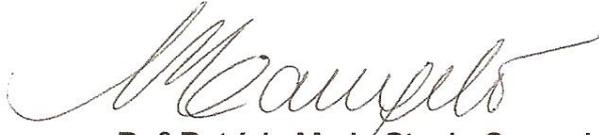
## TERMO DE APROVAÇÃO

MARÍLIA LOCATELLI CORRÊA FERREIRA

POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS DE FOLHAS DE *Artemisia absinthium* e  
*Artemisia vulgaris*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS SOBRE  
CÉLULAS THP-1

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão composta pelos professores:

  
Dr.<sup>a</sup> Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz (Orientadora)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

  
Dr.<sup>a</sup> Patrícia Maria Stuelp Campelo  
Departamento de Farmácia – PUCPR

  
Dr.<sup>a</sup> Selma Faria Zawadzki Baggio  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 17 de fevereiro de 2012.

A meus pais, Moacir e Rita pela graça da  
vida e por toda dedicação e amor.  
À minha irmã Rafaella pelo  
companheirismo, carinho e amizade.  
Ao meu esposo Rodrigo, pelo amor,  
amizade e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por orientar meus passos e permitir que eu chegasse até aqui hoje.

A meus pais Moacir e Rita, por toda a dedicação e carinho com os quais educaram a mim e a Rafa. Agradeço pelo incentivo à minha carreira acadêmica, pelos sacrifícios que fizeram para dar a mim e a Rafa uma educação de qualidade. E eu bem sei que não foi fácil, abdicando muitas vezes dos sonhos de vocês para viver os nossos. A minha conquista hoje, na verdade é nossa. Amo vocês!

Gostaria de agradecer também a minha irmã Rafaella, pela amizade, carinho, pelas conversas e por todo apoio. Ah! E também por me dar a honra de batizar o Pedrinho, meu afilhado lindo, alegria da minha vida! Amo vocês!

Ao meu esposo, Rodrigo, meu companheiro, amigo, parceiro. Agradeço por tudo, pelo amor, pelas ajudas, e especialmente por entender minhas ausências nos finais de semana, dedicados à realização de experimentos e estudos. Te amo muito!

A minha orientadora, Carmem, pela ajuda na correção da dissertação, pelas dicas e apoio durante todo o mestrado e por me iniciar na carreira acadêmica.

A minha co-orientadora Guilhermina, por me ensinar a trabalhar com células, por todo apoio, dicas e conversas.

Agradeço a todos os meus amigos do departamento de bioquímica, por tornarem mais alegres os meus dias. Aos meus amigos do cultivo, companheiros de final de semana, pelas ajudas e por me ensinarem a trabalhar no cultivo celular. Em especial à minhas parceiras de todos os dias, Ju Amorim, Carol Lane e Anna Paula.

Agradeço também ao João, meu parceiro de chá, que também trabalhou com as plantas medicinais, por toda ajuda, conselhos, amizade e por me auxiliar na realização dos experimentos.

Aos meus amigos do laboratório de carboidratos vegetais, Rogério, Lúcia, Marina e Monique, pela amizade e momentos de descontração e também a Nanna, que não está mais no laboratório, mas que teve uma participação importante na minha iniciação científica.

Aos meus amigos da turma do mestrado, pela amizade, pelas conversas e pelos cafés na cantina nos tempos das referatas e seminários.

Agradeço também a doutoranda Fhernanda Smiderle, por ceder gentilmente as células THP-1 utilizadas neste trabalho.

À empresa Santos Flora por atenciosamente fornecer o material vegetal da *Artemisia vulgaris* utilizado neste trabalho.

Às professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, Gláucia Martinez, Maria Eliane, Sheila Winnischofer e Silvia Cadena, por me ceder o uso dos equipamentos e reagentes do laboratório e também pelos ensinamentos e ajudas.

À professora Joana pelas palavras de motivação e carinho.

À Eliz e Rosane, pelas análises de HPSEC e GLC.

Ao Departamento de Química da UFPR, pela utilização do FT-IR e da balança analítica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao CNPq e Pronex-Carboidratos pelo auxílio financeiro.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima.”  
Louis Pasteur

## RESUMO

As plantas *Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris* são conhecidas popularmente como losna e artemísia, respectivamente. Estas espécies pertencem à família botânica Asteraceae e são conhecidas e comercializadas no mundo todo pelas suas propriedades medicinais. A parte aérea destas plantas é usada na medicina popular na preparação de chás, sob a forma de infusão, os quais são indicados no tratamento de inúmeras doenças. Neste trabalho, o chá preparado da forma tradicional e os polissacarídeos obtidos por precipitação etanólica das infusões das plantas foram caracterizados quimicamente e avaliados quanto a seus efeitos sobre células de leucemia humana (THP-1). Com relação à espécie *A. absinthium*, foram obtidos polissacarídeos por precipitação etanólica da infusão da parte aérea da planta. Após diversos processos de purificação, foi isolada uma arabinogalactana-proteína (AGP), a qual foi confirmada por análises químicas e espectroscópicas. Este polissacarídeo apresentou massa molar de 84.160 g/mol e é constituído por Rha, Ara, Man, Gal, Glc, GlcA e Xyl na proporção de 2,8: 4,1: 1,9: 9,3: 3,8: 2,1: 1. O extrato liofilizado obtido da infusão da parte aérea de *A. absinthium* apresentou 9,2% carboidratos, 2,7% de proteínas e 3,7% de fenólicos. Esta infusão é constituída predominantemente por compostos de baixa massa molar como verificado pelo alto tempo de eluição das amostras por cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC). Também foi obtida uma fração polissacarídica da infusão de *A. vulgaris*, a qual é composta majoritariamente (85%) por inulina, um carboidrato de reserva constituído por unidades de frutose ligadas  $\beta(2\rightarrow1)$ . A infusão de *A. vulgaris*, a qual apresentou 40% de carboidratos totais, também apresentava inulina como composto majoritário. Estes dados foram confirmados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por cromatografia em camada delgada (TLC). Além dos carboidratos, a infusão de *A. vulgaris* também apresentou 9,8% de fenólicos e 2,9% de proteínas. As frações polissacarídicas brutas de *A. absinthium* e *A. vulgaris*, assim como a AGP e as infusões das duas plantas foram utilizadas nos ensaios biológicos *in vitro* sobre as células THP-1. Todos os extratos testados foram capazes de induzir a diferenciação terminal dessas células, como verificado pela mudança na morfologia celular e adesão destas células à placa. Além disso, as infusões das espécies *A. absinthium* e *A. vulgaris* na concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$  também inibiram a proliferação das células leucêmicas em 42,6% e 46,0%, respectivamente, após 120 horas de tratamento. A fração polissacarídica bruta de *A. absinthium* também foi capaz de reduzir a proliferação das células THP-1 em 18,7%, após 120 horas de tratamento, na maior concentração testada (500  $\mu\text{g/ml}$ ). A infusão de *A. vulgaris*, que apresentou os melhores resultados sobre a proliferação celular, também afetou o ciclo celular da linhagem THP-1, induzindo parada das células na fase G2/M do ciclo, além de aumentar a porcentagem de células na fase sub-G1, o que representa início de apoptose. Baseados nos dados *in vitro* com as células THP-1, sugere-se que as infusões de *A. absinthium* e *A. vulgaris* podem auxiliar no tratamento de leucemias, em especial na leucemia mielóide aguda.

## ABSTRACT

*Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris* are plants known as “losna” and “artemisia”, respectively. These species belong to Asteraceae family and they are known and marketed throughout the world for its medicinal properties. The aerial parts are used in traditional medicine as tea (infusion), which is used to treat several diseases. In this study, the tea prepared according to the traditional way and the polysaccharides isolated from tea were chemically characterized and their effects on human THP-1 monocytic leukemia cell line were assayed. The crude polysaccharide fraction obtained from *A. absinthium* infusion was submitted to several purification steps to afford a fraction named API-F1. Chemical and spectroscopic analysis showed that this fraction is composed of arabinogalactan-protein, with 84,160 g/mol of molecular weight and complex structure. This fraction consisted of Rha, Ara, Man, Gal, Glc, GlcA and Xyl in a 2.8: 4.1: 1.9: 9.3: 3.8: 2,1: 1 molar ratio. Polysaccharides from *A. vulgaris* infusion are composed mainly of inulin, a storage carbohydrate constituted by  $\beta$ -fructose (1 $\rightarrow$ 2)-linked. The *A. vulgaris* infusion, which is composed of 40% of carbohydrates, also showed inulin as main compound. These data were confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), high-performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC). In addition to the carbohydrates, the infusion of *A. vulgaris* is composed for 9.8% phenolic compounds and 2.9% of proteins. The infusion of aerial parts from *A. absinthium* contained 9.2% of carbohydrates, 3.7% phenolic compounds and 2.7% protein. Both *A. absinthium* and *A. vulgaris* infusions are composed mainly of low molar mass compounds as shown by their elution profile obtained by high pressure size exclusion chromatography (HPSEC). The effects of the infusions of *A. absinthium* and *A. vulgaris*, the crude polysaccharides and the pure polysaccharide API-F1 were evaluated on THP-1 cell line. All extracts were able to induce terminal differentiation of THP-1 into macrophage-like cells. The differentiation was associated with alteration in cell morphology and increased adherence to tissue culture plastic. Furthermore, the *A. vulgaris* and *A. absinthium* infusions at 500  $\mu$ g/ml inhibited the proliferation of THP-1 cells in 46.0% e 42.6%, respectively. This maximum inhibiting rate was achieved 120h after treatment. The crude polysaccharide of *A. absinthium* (500  $\mu$ g/ml) was able to reduce in 18,7% the proliferation of THP-1 cells, at 120h. The *A. vulgaris* infusion, which provided the best results on cell proliferation, caused cell arrest in G2/M phase of cell cycle and induced apoptosis, as shown by the increased sub-G1 hypodiploid cell population. Results obtained from *in vitro* assays with THP-1 cells suggest that *A. absinthium* and *A. vulgaris* infusions can contribute to treatment of leukemia, particularly acute myelogenous leukemia.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MODELO DE ESTRUTURA DE UMA ARABINOGALACTANA-PROTEÍNA .....	25
FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS DE ACORDO COM O TIPO DE CÉLULA E LINHAGEM DE ORIGEM .....	32
FIGURA 3 – DIFERENCIAÇÃO CELULAR HEMATOPOIÉTICA E LINHAGENS DE LEUCEMIA .....	34
FIGURA 4 – <i>Artemisia absinthium</i> E O DETALHE DE SUAS FOLHAS .....	38
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO $\alpha$ -TUJONA .....	39
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS OITO COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM <i>A. absinthium</i> , ANALISADOS POR ABERHAM <i>et al.</i> (2010) .....	41
FIGURA 7 – DESENHO BOTÂNICO E PARTE AÉREA DE <i>Artemisia vulgaris</i> .....	43
FIGURA 8 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO SOMENTE DETECTOR DE ÍNDICE DE RÉFRAÇÃO DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> (AI) .....	69
FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> (AI). EXPERIMENTO REALIZADO EM D <sub>2</sub> O A 50 °C.....	70
FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DO POLISSACARÍDEO BRUTO OBTIDO A PARTIR DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> (API) .....	72
FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> .....	72
FIGURA 12 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PURIFICAÇÕES DO POLISSACARÍDEO BRUTO OBTIDO DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> .....	74
FIGURA 13 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DA FRAÇÃO API-F1, OBTIDA PELOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA BRUTA (API) EXTRAÍDA POR INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> .....	75
FIGURA 14 – ESPECTRO DE FT-IR DA FRAÇÃO API-F1 .....	76
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO API-F1 PURIFICADA DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> . EXPERIMENTO REALIZADO EM D <sub>2</sub> O, A 50 °C .....	78
FIGURA 16 – MODELO ESTRUTURAL PROPOSTO PARA AS CADEIAS LATERAIS DE ARABINANAS DA AGP DO PÓLEN DE <i>A. vulgaris</i> .....	81

FIGURA 17 – MODELO HIPOTÉTICO REPRESENTANDO AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA PORÇÃO POLISSACARÍDICA DAS AGPs .....	82
FIGURA 18 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> (VI) .....	85
FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> (VI). EXPERIMENTO REALIZADO EM D <sub>2</sub> O, A 50 °C .....	86
FIGURA 20 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO BRUTO OBTIDO A PARTIR DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> (VPI) .....	87
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO VPI OBTIDA POR INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> . EXPERIMENTO REALIZADO EM D <sub>2</sub> O, A 50 °C .....	88
FIGURA 22 - PERFIL CROMATOGRÁFICO (TLC) DAS AMOSTRAS DE <i>A. vulgaris</i> E <i>A. absinthium</i> HIDROLISADAS COM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 mmol/l (pH 2,0) POR 15 MINUTOS .....	90
FIGURA 23 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC DAS AMOSTRAS VI E VPI (HIDROLISADAS COM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 mmol/l, pH 2,0, 15 MINUTOS) COM O PADRÃO DE FRUTOSE .....	90
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO VPI-ELU OBTIDA APÓS DIVERSOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA BRUTA VPI. EXPERIMENTO REALIZADO EM D <sub>2</sub> O, A 50 °C .....	91
FIGURA 25 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS COM AS CÉLULAS THP-1 .....	93
FIGURA 26 – EFEITO DAS INFUSÕES E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> E <i>A. absinthium</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS THP-1d PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA .....	95
FIGURA 27 – EFEITO DAS INFUSÕES E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> E <i>A. absinthium</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS THP-1d PELO MÉTODO DO MTT .....	96
FIGURA 28 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS THP-1d TRATADAS COM AS INFUSÕES DE <i>A. absinthium</i> e <i>A. vulgaris</i> .....	98
FIGURA 29 – EFEITO DAS INFUSÕES E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> E <i>A. absinthium</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS THP-1 PELO MÉTODO DO AZUL DE TRIPAN .....	99
FIGURA 30 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS E DAS INFUSÕES OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> e <i>A. absinthium</i> SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 <i>IN VITRO</i> APÓS 24 HORAS (A) E 48 HORAS (B) DE TRATAMENTO .....	102

FIGURA 31 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS E DAS INFUSÕES OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> e <i>A. absinthium</i> SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 <i>IN VITRO</i> APÓS 72 HORAS (A) E 120 HORAS (B) DE TRATAMENTO .....	103
FIGURA 32 – ILUSTRAÇÃO DO CICLO CELULAR E SUAS FASES .....	104
FIGURA 33 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS THP-1 NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AS INFUSÕES DE <i>A. absinthium</i> e <i>A. vulgaris</i> .....	105
FIGURA 34 - ANÁLISE DE CICLO CELULAR DA LINHAGEM THP-1 .....	107
FIGURA 35 - EFEITO DA INFUSÃO PREPARADA A PARTIR DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> (AI) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1.....	109
FIGURA 36 – MUDANÇA DE MORFOLOGIA DAS CÉLULAS THP-1 EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM A INFUSÃO DE <i>A. absinthium</i> .....	110
FIGURA 37 - EFEITO DO POLISSACARÍDEO BRUTO OBTIDO DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> (API) E DA FRAÇÃO PURIFICADA (API-F1) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 .....	112
FIGURA 38 - EFEITO DA INFUSÃO PREPARADA A PARTIR DA PARTE AÉREA DE <i>A. vulgaris</i> (VI) E DO POLISSACARÍDEO BRUTO (VPI) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1.....	113

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE <i>A. absinthium</i> .....	73
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PURIFICADA API-F1 E DA FRAÇÃO APÓS CARBOXI-REDUÇÃO (API-CX) .....	79
TABELA 3 -	ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO API-F1 .....	80
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PURIFICADA API-F1 E DA FRAÇÃO OXIDADA COM PERIODATO (API-OPE) .....	83
TABELA 5 -	CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NAS AMOSTRAS VI e VPI .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	- Arabinogalactana-proteína
AI	- Infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
APG	- Angiosperm Phylogeny Group
API	- Polissacarídeo bruto obtido por infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
API-AM	- Fração resultante do tratamento com $\alpha$ -amilase a partir do polissacarídeo bruto (API) isolado da infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
API-CX	- Fração obtida após carboxi-redução da amostra pura API-F1, resultante da purificação do polissacarídeo bruto (API) isolado da infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
API-DI	- Fração retida em membrana de 12000 Da obtida a partir do polissacarídeo bruto (API) isolado da infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
API-EL	- Fração eluída em membrana de 30 kDa obtida a partir do polissacarídeo bruto (API) isolado da infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
API-F1	- Fração purificada, eluída em membrana de 0,1 $\mu$ m, obtida do polissacarídeo bruto (API) isolado da infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
API-IS	- Fração insolúvel em água fria, resultante do fracionamento por congelamento-degelo do polissacarídeo bruto (API) isolado da infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
API-OPE	- Amostra obtida após oxidação com periodato, realizada sobre a fração API-F1
API-RET	- Fração retida em membrana de 30 kDa obtida a partir do polissacarídeo bruto (API) isolado da infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
API-S	- Fração solúvel em água fria, resultante do fracionamento por congelamento-degelo do polissacarídeo bruto (API) isolado da infusão da parte aérea de <i>A. absinthium</i>
CaCl <sub>2</sub>	- Cloreto de cálcio
cdk	- Quinase dependente de ciclina
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
D <sub>2</sub> O	- Óxido de deutério
dept	- Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	- Dimetilsulfóxido
dn/dc	- Taxa de variação do índice de refração com relação à concentração
DP	- Desvio padrão

EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
FT-IR	- Espectroscopia no infravermelho incorporando transformador Fourier
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa
GLC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- Ácido sulfúrico
HBSS	- Solução salina balanceada de Hanks
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta performance
IFN-γ	- Interferon-gama
IgM	- Imunoglobulina M
IL-1	- Interleucina-um
IL-10	- Interleucina-dez
IL-1β	- Interleucina-um beta
IL-2	- Interleucina-dois
IL-6	- Interleucina-seis
KBr	- Brometo de potássio
KCl	- Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Dihidrogenofosfato de potássio
LPS	- Lipopolissacarídeo
MALLS	- Detector de espalhamento de luz laser em multiângulos
MgSO <sub>4</sub>	- Sulfato de magnésio
MTT	- Brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Fosfato de sódio dibásico
NaBH <sub>4</sub>	- Boroidreto de sódio
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaIO <sub>4</sub>	- Periodato de sódio
NaN <sub>3</sub>	- Azida de sódio
NaNO <sub>2</sub>	- Nitrito de sódio
NK	- Células Natural Killer
NO	- Óxido nítrico
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	- Pentóxido de fósforo
PBS	- Solução salina tamponada
PMA	- 12-miristato 13-acetato de forbol
RI	- Índice de refração
RMN- <sup>13</sup> C	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono
RPMI	- Meio Roswell Park Memorial Institute
TFA	- Ácido trifluoracético
THP-1d	- Células THP-1 diferenciadas com éster de forbol (PMA)
TNF-α	- Fator de necrose tumoral-alfa
UV	- Ultravioleta
VI	- Infusão da parte aérea de <i>A. vulgaris</i>
VPI	- Polissacarídeo bruto obtida por infusão da parte aérea de <i>A. vulgaris</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1 PLANTAS MEDICINAIS .....	19
2.2 POLISSACARÍDEOS DE PLANTAS .....	21
2.2.1 Polissacarídeos da parede celular .....	21
2.2.1.1 Arabinogalactanas .....	24
2.2.1.1.1 Arabinogalactanas-proteínas (AGPs) .....	25
2.2.2 Polissacarídeos de reserva .....	27
2.2.2.1 Frutanas .....	28
2.3 LEUCEMIA MONOCÍTICA AGUDA .....	31
2.4 LINHAGEM CELULAR THP-1.....	34
2.5 ESPÉCIES VEGETAIS AVALIADAS NO PRESENTE ESTUDO .....	35
2.5.1 Posicionamento sistemático .....	35
2.5.2 Gênero <i>Artemisia</i> .....	36
2.5.3 <i>Artemisia absinthium</i> .....	37
2.5.4 <i>Artemisia vulgaris</i> .....	43
2.6 JUSTIFICATIVA .....	45
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	47
3.1 OBJETIVO GERAL .....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
4.1 OBTENÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS .....	48
4.2 PREPARAÇÃO DO CHÁ (INFUSÃO) .....	48
4.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS POR INFUSÃO .....	48
4.4 PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO OBTIDO POR INFUSÃO DE <i>A. absinthium</i> .....	49
4.4.1 Diálise fechada .....	49
4.4.2 Fracionamento por congelamento e degelo .....	49
4.4.3 Remoção enzimática do amido .....	50
4.4.4 Fracionamento por filtração .....	50
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	51
4.5.1 Composição monossacarídica .....	51
4.5.2 Redução, acetilação e extração dos produtos acetilados .....	51
4.5.3 Hidrólise da frutana .....	52
4.5.4 Análise da homogeneidade .....	52
4.5.5 Determinação do $dn/dc$ e cálculo da massa molar .....	52

4.5.6	Carboxi-redução .....	53
4.5.7	Metilação .....	54
4.5.8	Oxidação com periodato de sódio .....	54
4.5.9	Polarimetria .....	55
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	55
4.6.1	Métodos cromatográficos .....	55
4.6.1.1	Cromatografia líquido-gasosa (GLC) .....	55
4.6.1.2	Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-MS) .....	56
4.6.1.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	56
4.6.1.4	Cromatografia em camada delgada .....	56
4.6.1.5	Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detecção por espalhamento de laser multiângulos, índice de refração e ultravioleta (HPSEC-MALLS/RI/UV) .....	57
4.6.2	Métodos espectroscópicos .....	57
4.6.2.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	57
4.6.2.2	Espectroscopia de infravermelho .....	58
4.6.3	Métodos espectrofotométricos .....	58
4.6.3.1	Dosagem de açúcar total .....	58
4.6.3.2	Dosagem de proteína .....	58
4.6.3.3	Dosagem de compostos fenólicos .....	58
4.6.3.4	Dosagem de ácidos urônicos .....	59
4.6.3.5	Dosagem de frutose .....	59
4.7	SOLUÇÕES E PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....	59
4.7.1	Soluções e meio de cultivo .....	59
4.7.1.1	Solução salina tamponada .....	60
4.7.1.2	Solução salina balanceada de Hank .....	60
4.7.1.3	Solução de Bouin .....	60
4.7.1.4	Meio de cultivo .....	60
4.7.2	Linhagem celular e cultivo .....	61
4.7.3	Preparo das soluções dos polissacarídeos e do chá liofilizado para avaliação da atividade biológica .....	61
4.7.4	Células THP-1 diferenciadas (macrófagos) .....	61
4.7.4.1	Indução da diferenciação celular .....	61
4.7.4.2	Avaliação da viabilidade celular .....	62
4.7.4.2.1	Método do MTT .....	62
4.7.4.2.2	Cristal Violeta .....	63
4.7.4.3	Análise da morfologia celular .....	64
4.7.5	Células THP-1 não-diferenciadas (monócitos) .....	64

4.7.5.1 Ensaio de viabilidade celular por azul de tripan .....	64
4.7.5.2 Avaliação da atividade antitumoral .....	65
4.7.5.2.1 Ensaio de indução da diferenciação .....	65
4.7.5.2.2 Ensaio de proliferação celular .....	66
4.7.5.2.3 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo .....	66
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	67
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	68
5.1 <i>Artemisia absinthium</i> .....	68
5.1.1 Obtenção e caracterização da infusão .....	68
5.1.2 Polissacarídeo da infusão – Obtenção, fracionamento e caracterização .....	71
5.1.3 Caracterização da fração API-F1 .....	75
5.2 <i>Artemisia vulgaris</i> .....	84
5.2.1 Obtenção e caracterização da infusão .....	84
5.2.2 Polissacarídeo da infusão – Obtenção e caracterização .....	87
5.3 EFEITOS DAS INFUSÕES E DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>A. absinthium</i> E <i>A. vulgaris</i> SOBRE AS CÉLULAS THP-1 .....	93
5.3.1 Estratégia experimental para os ensaios de atividade biológica .....	93
5.3.2 Células THP-1 diferenciadas (macrófagos) .....	94
5.3.2.1 Efeitos sobre a viabilidade celular .....	94
5.3.2.2 Ensaio de morfologia celular .....	97
5.3.3 Células THP-1 não-diferenciadas (monócitos) .....	99
5.3.3.1 Efeitos sobre a viabilidade celular .....	99
5.3.3.2 Efeitos sobre a proliferação celular .....	100
5.3.3.3 Análise do ciclo celular .....	104
5.3.3.4 Efeitos sobre a diferenciação celular .....	109
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	114
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	117
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	118

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento medicinal baseado no uso de plantas é conhecido como fitomedicina (TANG; HALLIWELL, 2010). Estima-se que a medicina não-convencional, a qual abrange uma série de terapias alternativas, incluindo a fitomedicina, seja utilizada por cerca de 70-80% da população mundial (BYARD, 2010).

As plantas *Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris* pertencem à família botânica Asteraceae e são conhecidas pelas suas propriedades medicinais. *Artemisia absinthium*, conhecida popularmente como losna, é usada como agente antipirético, antisséptico, anti-helmíntico, tônico, diurético e para o tratamento de dores no estômago (KORDALI *et al.*, 2005). *Artemisia vulgaris*, conhecida no Brasil por artemísia, é indicada como diurético, antipirético, estimulante de apetite, tônico, para o tratamento de doenças renais, além de atuar como hipoglicemiante (FOSTER; DUKE, 1999). Algumas das propriedades medicinais atribuídas a estas espécies já foram comprovadas cientificamente (TARIQ *et al.*, 2009; GILANI *et al.*, 2005). Grande parte destes estudos associa as atividades biológicas das ervas a compostos presentes no óleo essencial ou a outros metabólitos secundários das folhas destas espécies, no entanto, a participação dos polissacarídeos presentes no chá ainda não foi investigada. Polissacarídeos extraídos de outras espécies do mesmo gênero *Artemisia*, como *A. tripartita* e *A. princeps*, apresentaram propriedade de ativação de macrófagos (XIE *et al.*, 2008) e ação moduladora sobre o sistema complemento (ZHAO; KIYOHARA; YAMADA, 1994), respectivamente.

Polissacarídeos extraídos de diversas fontes têm atraído grande atenção por atuarem como modificadores da resposta biológica (SHIN *et al.*, 2002), em especial aqueles extraídos de plantas já exibiram inúmeras propriedades terapêuticas, como ação antitumoral (XU *et al.*, 2011) e cicatrizante (LEUNG *et al.*, 2006). Além disso, estas moléculas apresentam baixa toxicidade celular (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

As leucemias, originadas pela transformação maligna de precursores hematopoiéticos, são caracterizadas por proliferação descontrolada de células sem diferenciação. Os tratamentos atuais para a leucemia são a quimioterapia, uso de indutores da diferenciação e transplante de medula óssea (WU; LEE, 2011). Devido aos graves efeitos colaterais provocados pela maioria das quimioterapias, o estudo

de terapias alternativas, como a fitomedicina, torna-se cada vez mais importante como auxiliar no tratamento do câncer.

Estudos mostram que compostos isolados de plantas são potencialmente capazes de auxiliar no tratamento de leucemias, em especial da leucemia monocítica aguda, um subtipo de leucemia mielóide. Estes agentes podem agir diretamente nas células leucêmicas, apresentando um efeito antiproliferativo ou citotóxico (BANDERALI *et al.*, 2011), ou ainda atuando como um indutor da diferenciação terminal dos monócitos, cessando a proliferação celular (WU; LEE, 2011). Estes compostos também podem atuar indiretamente, estimulando a produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) por células do sistema imune, as quais por sua vez, podem induzir a diferenciação terminal das células leucêmicas imaturas. Outra abordagem como terapia auxiliar no tratamento do câncer é a ativação de macrófagos, os quais são capazes de reconhecer e eliminar células tumorais (KLIMP *et al.*, 2002).

*Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris* são consumidas popularmente como chá, o qual é preparado com a parte aérea da erva, principalmente sob a forma de infusão. Algumas espécies do gênero *Artemisia* já apresentam atividade antiproliferativa sobre alguns tipos de câncer (RETHY *et al.*, 2007; NAWAB *et al.*, 2011) o que motivou a escolha destas plantas para este trabalho. Após ampla revisão bibliográfica, não foi encontrado na literatura nenhum estudo sobre a composição polissacarídica da parte aérea de *A. absinthium* e *A. vulgaris*, portanto este trabalho visou isolar e caracterizar polissacarídeos obtidos por infusão da parte aérea destas espécies e verificar a ação antiproliferativa destes sobre células de leucemia humana THP-1, comparando ao efeito das infusões das ervas preparadas da forma tradicional.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A medicina alternativa conhecida também por medicina complementar compreende a soma de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, que são usadas para manter a saúde, prevenir doenças ou tratar desordens físicas e mentais. A fitomedicina é uma forma de medicina alternativa, a qual abrange além das ervas medicinais, preparações e produtos originados de plantas (OMS, 2008).

Nas últimas décadas, o interesse por terapias alternativas e pelo uso das plantas medicinais vem crescendo significativamente. Desde a Declaração de Alma-Ata, assinada na Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde em 1978, a Organização Mundial da Saúde tem enfatizado a necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em conta que 80% da população mundial depende destes produtos no que se refere à atenção primária de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O Brasil possui inúmeras vantagens e oportunidades para o desenvolvimento dessa terapêutica, podendo citar: (a) a maior diversidade vegetal do mundo; (b) ampla sociodiversidade; (c) uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e (d) tecnologia para validar cientificamente este conhecimento. Tais razões têm proporcionado o aumento do interesse popular e institucional em ampliar o uso da fitomedicina no Sistema Único de Saúde - SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Em 2006, o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ações decorrentes desta política foram manifestadas na elaboração do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovado em 2008, o qual além de garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais, também visa promover o uso sustentável da biodiversidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O Ministério da Saúde divulgou em fevereiro de 2009 uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), na qual estão incluídas 71

espécies vegetais com indicações para uso na atenção básica à saúde. A espécie *Artemisia absinthium*, objeto de estudo deste trabalho, está incluída nesta lista de plantas selecionadas pelo SUS. A finalidade da Rénisus é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de uma lista oficial de plantas medicinais e fitoterápicos a serem disponibilizados para uso da população, com segurança e eficácia (PORTAL DA SAÚDE, 2010).

O estudo das plantas medicinais tem proporcionado a descoberta de novos compostos biologicamente ativos, inclusive no desenvolvimento de drogas para a quimioterapia do câncer como os taxóides, a camptotecina e os alcalóides da *Vinca* (RETHY *et al.*, 2007).

Além do uso das plantas medicinais no tratamento do câncer, estas também são utilizadas por pacientes para amenizar os sintomas provocados pela doença e para reduzir a toxicidade das drogas usadas na quimioterapia (CHEN; SNEED; ZHOU, 2011). Em uma pesquisa realizada na Noruega por Engdal, Klepp e Nilsen (2009), cerca de 40% dos pacientes com câncer utilizavam concomitantemente com a quimioterapia algum tratamento baseado em plantas, sendo que os mais frequentes foram o alho, o gengibre, o chá verde e o suco de noni (*Morinda citrifolia*).

Apesar dos benefícios que as plantas medicinais apresentam, alguns aspectos devem ser levados em consideração. Em muitos países não existe legislação que regulamente a comercialização de produtos da medicina alternativa, sendo que um mesmo produto pode ser comercializado como alimento, suplemento alimentar ou mesmo medicinal, dependendo do país de origem. A identificação botânica incorreta da planta, má qualidade do produto e também adulteração, são outros problemas associados com a falta de fiscalização sobre estes produtos. Além disso, ainda há poucos estudos que comprovem a eficácia e segurança de produtos e práticas da medicina alternativa (OMS, 2008). O uso das ervas medicinais de maneira incorreta, em relação a dose ou modo de preparo, pode colocar em risco a vida do paciente, considerando que o consumo indevido de plantas medicinais tem sido algumas vezes relacionado com toxicidade ao coração, fígado, rins, sistema nervoso central e pele (CHEN; SNEED; ZHOU, 2011).

Existem diferentes métodos de preparo que fazem as plantas medicinais serem transformadas em medicamentos. O método mais usado é a extração de compostos da planta utilizando algum líquido extrator, como a água, com ou sem utilização de calor. Toda preparação que usa água e aquecimento é denominada de

chá, o qual pode ser preparado na forma de infusão ou decocção. A infusão consiste em colocar água fervente sobre as ervas, tampar o recipiente e após 10-15 minutos, filtrar a solução para remover as ervas. A decocção é preparada colocando a erva em água e fervendo em fogo baixo, por 5 a 20 minutos. Após repousar, o chá é coado para remoção das ervas (PANIZZA, 1996).

Na preparação do chá, além de compostos de baixa massa molar, como metabólitos secundários, também são extraídos compostos de alta massa molar. Na literatura, no entanto, grande parte dos trabalhos sobre plantas medicinais enfatiza apenas a participação dos metabólitos secundários como principais responsáveis pelo potencial biológico apresentado pelas ervas, sem considerar a importância dos compostos de alta massa, como os polissacarídeos, os quais também podem contribuir para os efeitos biológicos observados.

## 2.2 POLISSACARÍDEOS DE PLANTAS

Os polissacarídeos encontrados em vegetais normalmente são divididos em três grupos distintos: polissacarídeos de reserva, polissacarídeos de parede celular e exsudatos. Na condição em que o chá é preparado, polissacarídeos estruturais e de reserva presentes nas ervas podem ser extraídos. Portanto, uma breve revisão sobre estas duas classes de polissacarídeos será apresentada nos itens subsequentes.

### 2.2.1 Polissacarídeos da parede celular

Os carboidratos estruturais são os constituintes químicos mais abundantes dos tecidos das plantas, depois da água, isto porque constituem a parede celular que é a grande estrutura de suporte que envolve as células vegetais. A parede celular é o principal componente estrutural e funcional das plantas e está envolvida em diversos processos celulares, como a adesão célula-célula, divisão celular, delimitação da forma e crescimento celular, contribui com as propriedades

mecânicas apresentadas pelos órgãos vegetais, além de estar envolvida nos processos de sinalização celular (REITER, 1998; WILLATS *et al.*, 2000).

A parede celular é constituída por complexas macromoléculas, sendo cerca de 90% pertencente a classe dos carboidratos, os quais podem ser divididos em três grupos: celulose, hemiceluloses e pectinas (CARPITA; GIBEAUT, 1993; REITER, 1998; REID, 1997).

A celulose corresponde a fração insolúvel, obtida após a extração dos demais polissacarídeos, e está presente na parede celular de quase todas as plantas conhecidas. É particularmente abundante na parede celular secundária e constitui cerca de 20-30% da massa seca da parede primária (McNEIL; DARVILL; FRY, 1984; REID, 1997). A celulose apresenta-se na forma de microfibrilas, altamente insolúveis e que apresentam alta resistência à tração, de forma a suportar as pressões sofridas pelas células. As microfibrilas de celulose são formadas por cadeias lineares de glucose ligadas  $\beta(1\rightarrow4)$  e unidas ao longo de todo o comprimento por ligações de hidrogênio, o que confere grande resistência à estrutura da parede celular (CARPITA; McCANN, 2000; BUCKERIDGE; TINÉ, 2001).

As hemiceluloses são polissacarídeos que podem ser extraídos da parede celular com álcali. O domínio celulose-hemicelulose é responsável por definir a forma da célula, pois as hemiceluloses interagem especificamente com a celulose, orientando suas microfibrilas durante o processo de biossíntese da parede e direcionando a orientação do crescimento (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Segundo o modelo de parede celular mais aceito atualmente, proposto por Carpita e Gibeaut (1993), todas as dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas apresentam xiloglucana como hemicelulose principal. Este polímero consiste de uma cadeia principal de unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . Esta cadeia pode ser substituída em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-xilose, as quais podem estar substituídas em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-galactose, em uma proporção de aproximadamente 4:3:1, respectivamente (WHITE; RAO, 1953; CARPITA; GIBEAUT, 1993). Ainda, as unidades de  $\beta$ -D-galactose podem estar substituídas em O-2 por unidades de  $\alpha$ -L-fucose (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Na família Poaceae e outras famílias de monocotiledôneas proximamente relacionadas, a hemicelulose principal é a glucuronoarabinoxilana. Este polissacarídeo apresenta uma cadeia linear principal de xilose ligada  $\beta(1\rightarrow4)$ , sendo que algumas unidades apresentam ramificações de  $\alpha$ -L-arabinose em O-3 e, menos

frequentemente, a cadeia principal ainda pode estar substituída em O-2 por unidades de  $\alpha$ -D-ácido glucurônico (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Outras hemiceluloses também são encontradas em menor quantidade na parede celular de plantas, como glucomananas, galactoglucomananas e galactomananas, que também apresentam potencial de se ligar às microfibrilas de celulose da parede (CARPITA; McCANN, 2000).

As pectinas são polímeros da parede celular extraídos por quelantes de cálcio como soluções de oxalato de amônio ou EDTA. Estes polissacarídeos são encontrados na parede celular primária e também na lamela média, localizada entre as células vegetais. As pectinas são polímeros ricos em ácido galacturônico, ramnose, galactose e arabinose e, por serem moléculas carregadas, atuam como principal elemento regulador da porosidade, alterando a permeabilidade a moléculas neutras, além de possuírem a propriedade de alterar o ambiente iônico ao qual a célula está exposta (JARVIS, 1988; REID, 1997; CARPITA; McCANN, 2000; BUCKERIDGE; TINÉ, 2001).

As pectinas são uma família de polissacarídeos constituídos por duas classes de polímeros conhecidos como homogalacturonanas (HG) e ramnogalacturonanas (RG). As homogalacturonanas são polímeros lineares de unidades de D-ácido galacturônico ligadas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). As ramnogalacturonanas (RG) são classificadas em dois tipos: RGI e RGII. A cadeia principal de RGI é composta por unidades alternadas de ácido galacturônico e ramnose unidos por ligação (1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -D-GalA (McNEIL; DARVILL; FRY, 1984; CARPITA; McCANN, 2000). Aproximadamente metade das unidades de ramnose da cadeia principal das RGI encontra-se ramificada em O-4 por outros polissacarídeos, compostos predominantemente por açúcares neutros, sendo eles as arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (McNEIL; DARVILL; FRY, 1984; CARPITA; McCANN, 2000). As RGII são polímeros relativamente pequenos e que apresentam açúcares raros, como apiose, ácido acérico, O-metil-fucose, entre outros (McNEIL; DARVILL; FRY, 1984). Este tipo de polissacarídeo é encontrado na parede celular primária de plantas e por estar presente em baixa quantidade provavelmente seu papel principal esteja relacionado à função de reconhecimento/sinalização celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993; REID, 1997).

Dentre os polissacarídeos presentes na parede celular, as arabinogalactanas, encontradas no material de estudo deste trabalho, serão abordadas no item subsequente.

### 2.2.1.1 Arabinogalactanas

Polissacarídeos compostos majoritariamente por arabinose e galactose são denominados de arabinogalactanas. Estas macromoléculas são encontradas na maioria dos tecidos das plantas e podem ser isoladas como polissacarídeos livres (WU *et al.*, 2005) ou em associação covalente com proteínas (HILLESTAD; WOLD; ENGEN, 1977).

As arabinogalactanas podem ser divididas em dois grupos de acordo com a sua estrutura: arabinogalactanas do tipo I e arabinogalactanas do tipo II. Arabinogalactanas do tipo I são polímeros compostos por  $\beta$ -D-galactopiranosose unidas por ligação (1 $\rightarrow$ 4) e substituídas por arabinose ou oligossacarídeos de arabinose (CLARKE; ANDERSON; STONE, 1979). Este tipo de arabinogalactanas é encontrado somente associado com pectinas, como ramificação de RGI, e nenhum polissacarídeo deste grupo foi encontrado associado com proteínas (CARPITA; McCANN, 2000).

As arabinogalactanas do tipo II são formadas por cadeias curtas de (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -galactanas conectadas umas as outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6. As cadeias laterais frequentemente terminam em unidades de arabinose, além de outros açúcares como fucose, ramnose e ácido glucurônico. Além destes monossacarídeos, as arabinogalactanas do tipo II também podem conter pequenas proporções de manose, xilose e glucose (CLARKE; ANDERSON; STONE, 1979; FINCHER; STONE; CLARKE, 1983; GASPAR *et al.*, 2001, SEIFERT; ROBERTS, 2007). Este segundo tipo de arabinogalactana está amplamente distribuído nos tecidos das plantas, sendo encontrada em sementes, folhas, raízes e frutos (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983).

As arabinogalactanas do tipo II são os constituintes da porção de carboidrato das glicoproteínas denominadas de arabinogalactanas-proteínas (AGPs), (SHOWALTER, 1993).

### 2.2.1.1.1 Arabinogalactanas-proteínas (AGPs)

As AGPs consistem de um núcleo protéico de comprimento variável e uma ou mais cadeias laterais de arabinogalactanas, as quais constituem mais de 95% da molécula, sendo que há somente 2-10% de proteína na composição (SHOWALTER, 1993; CARPITA; McCANN, 2000). A massa molar destes polímeros varia amplamente no reino vegetal, provavelmente por refletir diferentes graus de glicosilação (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983; SHOWALTER, 1993). Um esquema da composição e estrutura das AGPs está demonstrado na figura 1. A estrutura fina das AGPs é bastante complexa, mas com base em estudos de oxidação das arabinogalactanas com periodato, diversos grupos propuseram que a cadeia principal de  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 3) é interrompida a cada 7 unidades de galactose por uma ligação susceptível ao periodato, que pode ser constituída por unidades de  $\alpha$ -L-Araf (1 $\rightarrow$ 5) ou por (1 $\rightarrow$ 6) $\beta$ -D-Galp. Nesta estrutura, açúcares como o ácido glucurônico e ramnose aparecem como terminais não-redutores (GASPAR *et al.*, 2001).

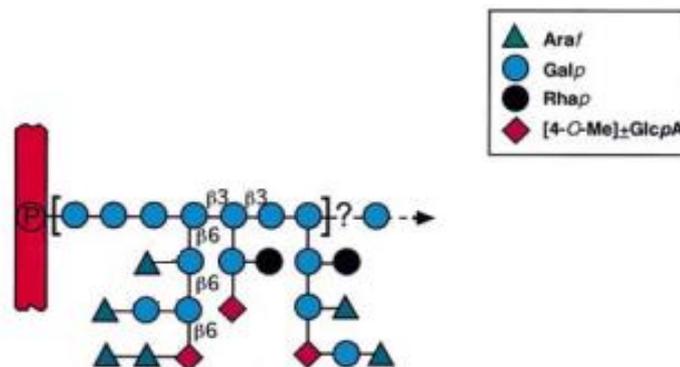


FIGURA 1 – MODELO DE ESTRUTURA DE UMA ARABINOGALACTANA-PROTEÍNA.

NOTA: Estrutura esquemática geral das AGPs. Em vermelho à esquerda está representada a porção protéica das AGPs. Os açúcares estão representados como círculos, triângulos e losangos. Neste modelo, a cadeia de  $\beta$ -D-Galp unida por ligação (1 $\rightarrow$ 3) é interrompida por uma substituição de uma unidade de monossacarídeo susceptível à degradação por periodato, representada como um ponto de interrogação. Monossacarídeos como ácido glucurônico, ramnose e arabinose são encontrados como terminais não-redutores na molécula.

FONTE: Adaptado de GASPAR *et al.*, 2001.

As AGPs já foram isoladas de diferentes órgãos vegetais, como frutos (QIN *et al.*, 2011; REDGWELL *et al.*, 2011), flores (GANE *et al.*, 1995), cultura de células vegetais em suspensão (MAURER *et al.*, 2010), folhas (HILLESTAD; WOLD; ENGEN, 1977) e sementes (ZIPPEL; WELLS; HENSEL, 2010). A análise estrutural destas moléculas revela a ampla variedade e complexidade exibida por tais polímeros. Em geral, a porção carboidrato destas moléculas apresenta a estrutura básica das arabinogalactanas do tipo II, sendo que a variação entre elas consiste principalmente na estrutura e composição das cadeias laterais, massa molar e identidade das unidades terminais.

Classen *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram AGPs de raízes de *Baptisia tinctoria* e *Echinacea pallida*. As AGPs foram obtidas por decocção (10 min) das raízes e isoladas por precipitação com o reagente de Yariv, o qual especificamente precipita estas glicoproteínas. A AGP de *Baptisia tinctoria* apresentou unidades de ramnose como terminais não-redutores e galactose 4-ligada, o que não foi encontrado em *Echinacea pallida*. Outra diferença encontrada entre as AGPs destas espécies foi a proporção de Ara:Gal nos polímeros. Esta variação na estrutura fina também resultou em diferenças na atividade biológica apresentada pelos polímeros.

As AGPs também são encontradas em flores no tecido reprodutivo feminino (GANE *et al.*, 1995) e, portanto, são fonte potencial das AGPs encontradas no mel. Uma fração contendo AGPs isolada por precipitação com reagente de Yariv do mel *kanuka* da Nova Zelândia, apresentou uma estrutura altamente ramificada, de alta massa molar (110 kDa), com ácido glucurônico e ramnose como terminais não-redutores, além da arabinose (STEINHORN *et al.*, 2011).

Frações contendo AGPs também já foram isoladas de frutos de *Lycium chinense*, as quais além de arabinose, apresentaram ácido galacturônico como terminal não-redutor e a massa molar variou de 71 a 120 kDa dependendo da fração.

A respeito da localização celular, as AGPs podem ser encontradas na membrana plasmática, na parede celular, no espaço extracelular e em secreções como a superfície do estigma floral e em exsudatos (ELLIS *et al.*, 2010).

Em concordância com sua ampla distribuição nas plantas, as AGPs têm sido associadas a diversas funções, que variam desde papéis no crescimento e desenvolvimento vegetal até na morte celular programada (GOLLNER *et al.*, 2011).

Além das importantes funções que as AGPs desempenham nas plantas, estas moléculas também têm sido estudadas quanto as suas propriedades biológicas em humanos (GOLLNER *et al.*, 2011). Em geral, os efeitos biológicos apresentados por estes polissacarídeos podem estar associados com seu potencial imunomodulador. Thude *et al.* (2006) demonstraram que uma AGP isolada da parte aérea da planta *Echinaceae purpurea*, uma planta medicinal, é capaz de se ligar à superfície de células do sistema imune, como linfócitos, monócitos e granulócitos humanos. Isso sugere que este polissacarídeo liga-se a estruturas ou receptores comuns aos três tipos celulares.

AGPs isoladas das raízes de *Baptisia tinctoria* e *Echinacea pallida* e de células de cultura em suspensão de *Echinaceae purpurea* estimularam diferentemente a proliferação e a produção de IgM por linfócitos de camundongos, e também a produção de NO e IL-6 em macrófagos alveolares *in vitro*. As AGPs isoladas de raízes apresentaram maior ação sobre os parâmetros imunológicos avaliados do que a AGP isolada das células em cultura. Isto sugere que características estruturais das AGPs estão associadas com os diferentes efeitos biológicos apresentados por estas moléculas. O aumento na produção de NO e IL-6, promovido pelas AGPs das raízes, provavelmente está relacionado a ativação de macrófagos por estes polissacarídeos (CLASSEN *et al.*, 2006).

O sistema complemento, que faz parte da resposta imune inata dos organismos, também foi alvo de modulação por AGPs. Samuelsen *et al.* (1998) isolaram uma AGP das folhas de *Plantago major* (tanchagem), a qual apresentou modulação sobre o sistema complemento.

### 2.2.2 Polissacarídeos de reserva

Os carboidratos acumulados como reserva nas plantas apresentam a função de fornecer monossacarídeos para serem utilizados metabolicamente durante o crescimento e desenvolvimento da planta. Os monossacarídeos podem ser armazenados na forma de dissacarídeos, como a sacarose e a trealose, e também na forma de oligo- e polissacarídeos, como as frutanas e o amido. Além destes polímeros existem também os polissacarídeos de reserva de parede celular, os

quais apresentam a estrutura semelhante aos carboidratos que formam a estrutura da parede, mas que desempenham função estrutural e de reserva de nutriente. Entre estes polissacarídeos destacam-se as xiloglucanas e as galactomananas (AVIGAD; DEY, 1997). As frutanas, encontradas no material de estudo deste trabalho, serão aprofundadas no item subsequente.

### 2.2.2.1 Frutanas

As frutanas são, depois do amido, os carboidratos de reserva mais abundantes encontrados em plantas (AVIGAD; DEY, 1997). Elas são polímeros de frutose com ou sem unidades de glucose na sua estrutura (HASKA; NYMAN; ANDERSSON, 2008). Estes polímeros são ácido-lábeis, solúveis em água e polidispersos em relação ao tamanho da cadeia, presença de glucose e tipos de ligações. As frutanas são conhecidas por serem carboidratos de reserva de curto prazo, mas em dicotiledôneas, frutanas do tipo inulina são acumulados como reserva de longo prazo em órgãos subterrâneos, como nas raízes e tubérculos (VAN DEN ENDE; VAN LAERE<sup>1</sup>, 2007, citado por VALLURU; VAN DEN ENDE, 2008).

Além da sua função como carboidrato de reserva, as frutanas também estão envolvidas em outros processos, como a tolerância ao estresse hídrico e ao frio, através da estabilização da membrana celular (HINCHA *et al.*, 2007; LIVINGSTON; HINCHA; HEYER, 2009). A acumulação de frutanas em plantas que normalmente não as produzem, pode estar relacionado a proteção contra o estresse hídrico (VIJN; SMEEKENS, 1999).

Cerca de 15% das angiospermas apresentam frutanas como carboidrato de reserva, sendo encontradas em 5 ordens: Poales, Liliales, Asterales, Campanulales e Polemoniales (segundo a classificação de Cronquist, 1988). Entre as gramíneas, as frutanas aparecem em grande quantidade em apenas uma única subfamília Pooideae, a qual inclui cereais como a aveia, a cevada e o centeio (HENDRY, 1993; VIJN; SMEEKENS, 1999).

---

<sup>1</sup> VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. Fructans in dicotyledonous plants: occurrence and metabolism. In: Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S, eds. **Recent advances in fructo-oligosaccharides research**. Trivandrum, India: Research Signpost, 2007. p. 1–14.

As frutanas são sintetizadas a partir da sacarose pela ação de enzimas específicas, as frutossiltransferases, as quais transferem a frutose da sacarose para a cadeia de frutana em crescimento. A síntese das frutanas é induzida por altas concentrações de sacarose, sendo produzidas e armazenadas dentro dos vacúolos da célula vegetal (VIJN; SMEEKENS, 1999; RITSEMA; SMEEKENS, 2003).

As frutanas de plantas apresentam uma grande variedade de ligações entre as unidades de frutose e possuem na extremidade inicial da cadeia uma unidade de  $\alpha$ -D-Glc, unida por uma ligação do tipo (2 $\rightarrow$ 1) à cadeia de frutose (EDELMAN; JEFFORD, 1968).

De acordo com o tipo de ligação presente, as frutanas encontradas em plantas superiores podem ser classificadas em: inulina, levana, levana mista, inulina *neoseri* e levana *neoseri* (VIJN; SMEEKENS, 1999):

- a) Inulina: consiste de unidades de  $\beta$ -D-Fru unidas por ligação (2 $\rightarrow$ 1) e são geralmente encontradas em plantas da ordem Asterales;
- b) Levana: também é um polímero linear e apresenta ligações  $\beta$ (2 $\rightarrow$ 6) entre as unidades de frutose. É a principal frutana de monocotiledôneas, sendo encontrada em algumas gramíneas. A levana e a inulina apresentam a mesma estrutura de cadeia (Glc-Fru-Fru) somente diferindo no tipo de ligação entre as unidades de frutose;
- c) Levana mista: são polímeros ramificados, também chamados de graminanas, os quais apresentam tanto ligações (2 $\rightarrow$ 1) quanto (2 $\rightarrow$ 6) entre as unidades de  $\beta$ -D-Fru e são encontradas na maioria das espécies de plantas da ordem Poales;
- d) Inulina *neoseri*: apresenta o mesmo tipo de ligação da inulina, no entanto, possui uma unidade de glucose no centro da molécula, apresentando uma cadeia de frutose em ambas as extremidades da glucose ( $_n$ Fru-Fru-Glc-Fru-Fru $_n$ ). Estas frutanas são geralmente encontradas em plantas da família Liliaceae;
- e) Levana *neoseri*: estes polímeros possuem ligações do tipo (2 $\rightarrow$ 6) entre as unidades de  $\beta$ -D-Fru e assim como a inulina *neoseri* apresenta cadeias de frutose em ambas as extremidades da glucose. São encontradas em algumas plantas da ordem Poales (VIJN; SMEEKENS, 1999).

Além da função como carboidrato de reserva e seu papel na proteção das plantas contra o estresse abiótico, as frutanas têm sido utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica. As frutanas são consideradas alimentos funcionais, devido a seus efeitos benéficos a saúde, como por exemplo auxiliar na absorção de cálcio pelo intestino, prevenindo a osteoporose (SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2001).

A inulina das raízes de chicória (*Cichorium intybus*) é atualmente a principal fonte utilizada pela indústria alimentícia mundial, sendo usada na preparação de iogurtes e sorvetes como um substituinte de baixo valor calórico da gordura, pois quando emulsificado à água, a inulina forma um gel de textura similar à gordura (RITSEMA; SMEEKENS, 2003).

Com relação as suas propriedades biológicas, as frutanas parecem estar envolvidas na modulação positiva do sistema imune, principalmente no aumento da resistência a infecções, atividade microbida, bem como na redução de reações alérgicas e terapia do câncer em modelos experimentais (revisado por CHOQUE-DELGADO; TAMASHIRO; PASTORE, 2010).

Em relação ao potencial imunomodulador das frutanas, Lee *et al.* (2011) demonstraram que uma frutana altamente ramificada isolada a partir da decoção de uma preparação de ervas japonesas denominada “Chikuyo-Sekko-To” apresentava propriedade imunomodulatória. Esta preparação consiste de uma mistura de partes aéreas, raízes e sementes de 7 diferentes plantas medicinais. A frutana isolada mostrou-se como um polissacarídeo imunomodulador, estimulando a produção de óxido nítrico e induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) em células RAW 264.7. Este polissacarídeo também apresentou atividade antiviral contra o vírus da *Herpes simplex* do tipo 2.

Oligossacarídeos de frutose também apresentaram efeito antitumoral *in vivo*. Ratos alimentados com dieta suplementada por 15% destes oligossacarídeos apresentaram menor número de tumores, bem como reduzida incidência de metástase provocada por câncer de mama em relação ao grupo controle (TAPER; ROBERFROID, 1999).

Além das frutanas, diversos polissacarídeos isolados de plantas têm atraído grande atenção nos campos da bioquímica e farmacologia, exibindo inúmeras propriedades biológicas importantes, como atividades antitumorais (PARK; LAI; KIM, 2004), imunomoduladoras (XIE *et al.*, 2008) e anti-inflamatórias (POPOV *et al.*, 2005), cujos efeitos estão relacionados as suas estruturas químicas (YANG;

ZHANG, 2009). Com relação à atividade antitumoral, polissacarídeos extraídos de diferentes fontes já apresentaram ação contra células humanas de câncer gástrico (XU *et al.*, 2011), câncer de mama (TAPER; ROBERFROID, 1999) e também sobre células de leucemia humana (WU; LEE, 2011).

### 2.3 LEUCEMIA MONOCÍTICA AGUDA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo responsável por 7,6 milhões de óbitos em 2008, o que corresponde a cerca de 13% de todas as mortes ocorridas neste período. Com relação às leucemias, no mesmo ano foram estimados cerca de 351 mil novos casos e 257 mil óbitos (INCA, 2012).

O desenvolvimento do câncer é resultado de um processo de vários passos, envolvendo alterações genéticas que levam à transformação maligna de células (LOHRUM; STUNNENBERG; LOGIE, 2007). Células tumorais, diferentemente de células normais, tornam-se independentes de fatores de crescimento, resistentes à apoptose e insensíveis à sinais antiproliferativos, o que resulta em células com um programa de proliferação descontrolado, permitindo a geração de uma vasta população de células-clone cancerígenas (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

As neoplasias hematológicas são caracterizadas pela transformação maligna de células derivadas dos precursores hematopoiéticos e tem como principal característica o acúmulo destas células jovens (blásticas) anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais (MOASSER, 2007; INCA, 2012). Diferentes neoplasias hematológicas podem surgir de cada um dos tipos celulares maduros e a classificação das leucemias se baseia no tipo de célula que sofreu a transformação (MOASSER, 2007). Um resumo dos tipos de leucemias e seus precursores normais está representado na figura 2. As leucemias podem ser divididas em dois grupos quanto ao tipo de célula de origem: (1) leucemia mielóide (LM), derivada da linhagem de células-tronco mielóides, a qual dá origem a monócitos, granulócitos, eritrócitos e plaquetas e (2) leucemia linfóide (LL), originada da transformação de células-tronco linfóides, precursora dos linfócitos B e T (MOASSER, 2007). O tipo de leucemia mais frequente em crianças é a leucemia

linfóide aguda (LLA) e em adultos a leucemia mielóide aguda (LMA) é a mais comum (INCA, 2011).

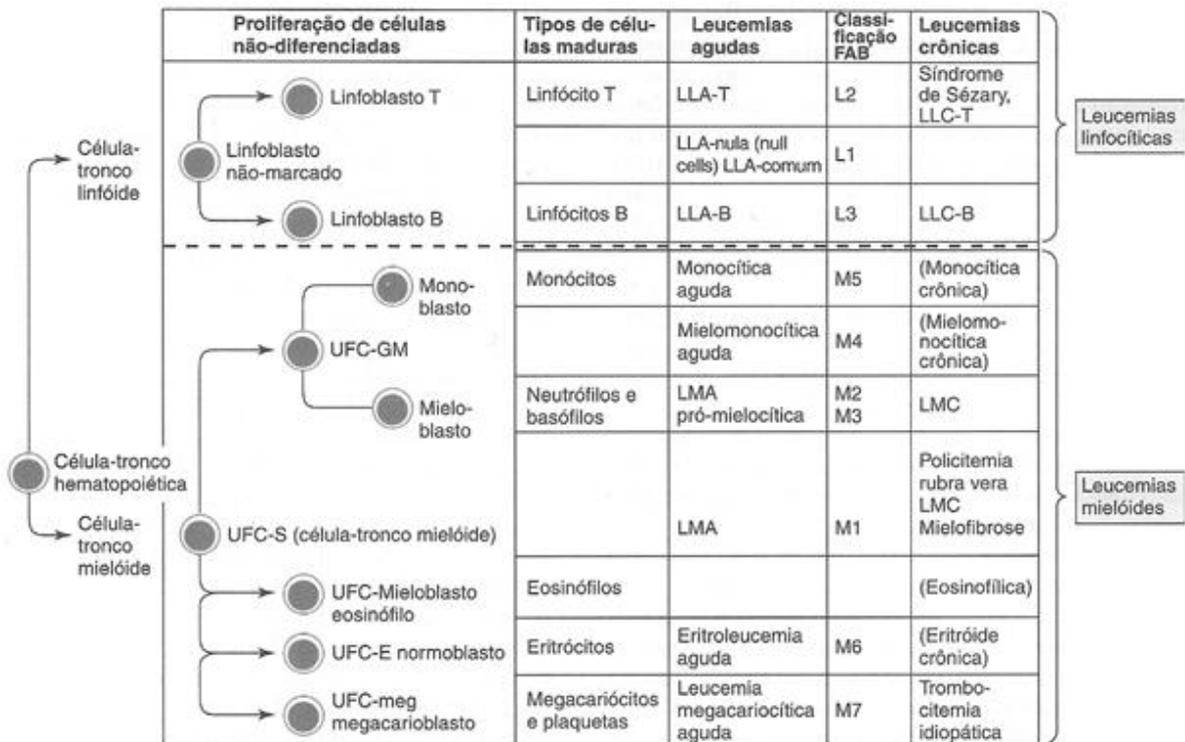


FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS DE ACORDO COM O TIPO DE CÉLULA E LINHAGEM DE ORIGEM.

NOTA: UFC – Unidade Formadora de Colônia; GM – Granulócito-Monócito; E – Eritrócito; LMA – Leucemia Mieloblástica Aguda; LMC – Leucemia Mielocítica Crônica; LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda; LLC – Leucemia Linfocítica Aguda.

FONTE: MOASSER, 2007.

A LMA apresenta vários subtipos: mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritrocítica e megacariocítica, as quais são classificadas pelo tipo celular dos quais elas derivam (SCHWARTING *et al.*, 2006; INCA, 2012). A leucemia monocítica aguda, com a qual o presente trabalho está relacionado, é derivada de precursores mielóides já comprometidos com a linhagem dos monócitos e é um subtipo relativamente incomum de LMA, compreendendo cerca de 5-8% de todos os casos. A leucemia monocítica é comum na primeira infância e tem uma evolução clínica bastante agressiva (FUNG *et al.*, 1995; SCHWARTING *et al.*, 2006; MOASSER, 2007). O acúmulo das células neoplásicas na medula óssea interfere na produção dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, o que leva a anemia, infecções e até mesmo hemorragias (INCA, 2012).

Atualmente, as terapias usadas no tratamento da leucemia incluem a quimioterapia, uso de indutores da diferenciação e transplante de medula óssea (WU; LEE, 2011). Devido aos graves efeitos colaterais provocados pela maioria das quimioterapias, o estudo de terapias alternativas no tratamento do câncer, como a fitomedicina, torna-se cada vez mais importante.

Diversas substâncias isoladas de plantas têm se mostrado capazes de ajudar a combater células de leucemia monocítica *in vitro*. Estes agentes podem agir diretamente nas células leucêmicas, apresentando um efeito antiproliferativo ou citotóxico (BANDERALI *et al.*, 2011) ou ainda agindo como indutores da diferenciação dos monócitos, cessando a proliferação celular (WU; LEE, 2011). Estes compostos também podem atuar indiretamente, estimulando a produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) por células do sistema imune, as quais por sua vez, podem induzir a diferenciação terminal de células leucêmicas. Alguns compostos, no entanto, podem agir das duas formas (WU; LEE, 2011). Um polissacarídeo bruto isolado de sementes de *Fagopyrum tataricum* foi capaz de induzir a diferenciação de uma linhagem de leucemia monocítica humana (THP-1) a macrófagos tanto diretamente quanto indiretamente, por estimular a secreção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico *in vitro* (WU; LEE, 2011).

Atuando de forma direta sobre as células leucêmicas, ginsenosídeos, que são saponinas triterpênicas isoladas de *Panax ginseng*, foram capazes de inibir a proliferação de células leucêmicas, induzindo o processo de apoptose (POPOVICH; KITTS, 2002).

Outra abordagem como terapia auxiliar no tratamento do câncer é a ativação de macrófagos, os quais são capazes de reconhecer e matar as células tumorais, inclusive aquelas que são resistentes à drogas citostáticas (KLIMP *et al.*, 2002). Macrófagos ativados podem agir diretamente sobre as células neoplásicas, liberando espécies reativas de oxigênio e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), os quais são tóxicos para as células tumorais. Outra forma utilizada pelos macrófagos para combater células tumorais é através da secreção de citocinas e do processamento e apresentação de antígenos, desencadeando respostas de defesa em outras células do sistema imune (KLIMP *et al.*, 2002).

## 2.4 LINHAGEM CELULAR THP-1

Estudos para avaliar a função de monócitos/macrófagos são geralmente limitados, já que estas células não podem ser expandidas *ex vivo*. Atualmente, diversas linhagens de células de leucemia humana, bloqueadas em determinados passos do processo de diferenciação, estão disponíveis para este fim (figura 3), como por exemplo, as células THP-1 (AUWERX, 1991; DAIGNEAULT *et al.*, 2010). Estas células constituem uma população homogênea, o que representa uma vantagem em relação aos monócitos humanos nativos, facilitando estudos bioquímicos (AUWERX, 1991).

A linhagem celular (THP-1) foi estabelecida por Tsuchiya *et al.* (1980) a partir de blastos do sangue de um garoto de 1 ano diagnosticado com leucemia monocítica aguda. Esta linhagem é amplamente usada como modelo experimental em estudos *in vitro* para identificação de novas drogas contra leucemia mielóide aguda (BANDERALI *et al.*, 2011).

Além disso, esta linhagem celular também é um modelo bem estabelecido para estudos toxicológicos (MULLER *et al.*, 2003; CORSINI *et al.*, 2011), imunológicos (SMIDERLE *et al.*, 2011) e “screening” para drogas antileishmanicida (GEBRE-HIWOT *et al.*, 1992).

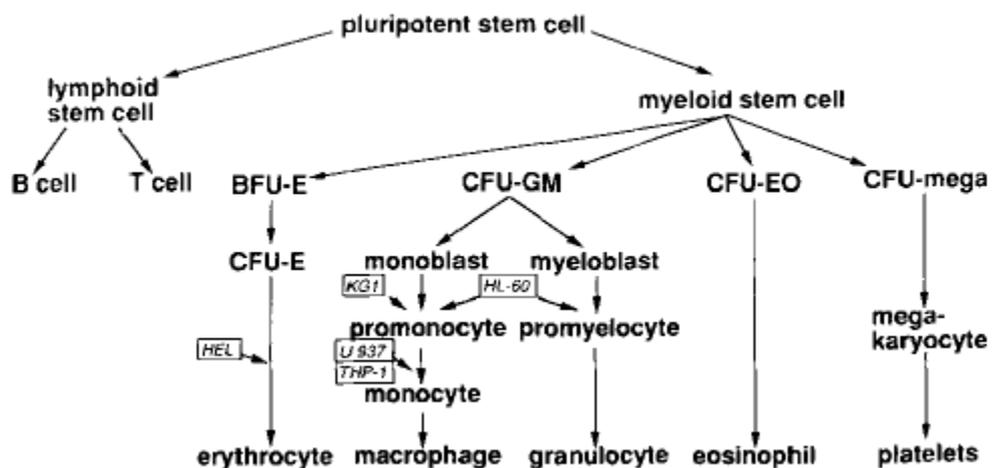


FIGURA 3 – DIFERENCIAÇÃO CELULAR HEMATOPOIÉTICA E LINHAGENS DE LEUCEMIA.

NOTA: Nos retângulos estão demonstradas algumas linhagens de leucemia disponíveis e as setas ao redor delas indicam o potencial de diferenciação *in vitro*.

FONTE: AUWERX, 1991.

Células leucêmicas são caracterizadas por proliferação descontrolada, sem diferenciação. Apesar disso, sob condições apropriadas, células de leucemia monocítica podem ser induzidas a diferenciação terminal em macrófagos por vários compostos, como o éster de forbol - PMA (12-miristato 13-acetato de forbol) (BARENSEN; CHEN, 1992). O tratamento destas células com o agente indutor *in vitro* provoca parada na proliferação celular e adesão destas células à placa. O processo de diferenciação é acompanhado por uma mudança drástica na morfologia celular, marcada pelo aumento do volume e grânulos citoplasmáticos devido ao maior número de organelas como mitocôndrias e lisossomos (AUWERX, 1991; DAIGNEAULT *et al.*, 2010).

Como a diferenciação celular induz parada na proliferação das células leucêmicas, a busca por compostos naturais que possam afetar a proliferação ou induzir a diferenciação de células de leucemia monocítica, constitui interessante abordagem terapêutica no tratamento deste subtipo de leucemia mielóide aguda.

## 2.5 ESPÉCIES VEGETAIS AVALIADAS NO PRESENTE ESTUDO

### 2.5.1 Posicionamento sistemático

A classificação sistemática das espécies estudadas neste trabalho, segundo a classificação botânica APG III (STEVENS, 2008) é:

Reino: Plantae  
Clado: Angiospermas  
Clado: Eudicotiledôneas  
Clado: Asterids  
Clado: Campanulids  
Ordem: Asterales  
Família: Asteraceae  
Subfamília: Asteroideae  
Tribo: Anthemideae

Gênero: *Artemisia*

Espécies: *Artemisia vulgaris* L.

*Artemisia absinthium* L.

### 2.5.2 Gênero *Artemisia*

Asteraceae é a maior família do grupo Eudicotiledôneas e muitas das plantas deste clado são usadas na medicina popular para uma variedade de indicações, incluindo espécies conhecidas como artemísia, losna, carqueja e guaco (BERETTA *et al.*, 2008). Esta família abrange espécies com hábito arbóreo, arbustivo, herbáceo e lianas que estão amplamente distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo (CANCELLI; EVALDT; BAUERMANN, 2007). Fitoquimicamente, esta família é caracterizada por apresentar polifrutanas (principalmente inulina) como carboidrato de reserva (GURIB-FAKIM, 2006).

O gênero *Artemisia*, incluído na família botânica Asteraceae, é cosmopolita, com polinização através do vento, distribuído em áreas temperadas, de médias a altas latitudes do hemisfério norte, colonizando também regiões áridas e semi-áridas, com somente poucos representantes no hemisfério sul (HAYAT *et al.*, 2009).

Muitos representantes do gênero *Artemisia* possuem alto valor econômico e têm sido usados na medicina, na alimentação, como ornamentação ou como estabilizadores do solo em ambientes degradados. Algumas espécies ainda são tóxicas e outras são ervas invasivas, causando danos a plantações (TAN; ZHENG; TANG, 1998).

Objeto de diversos estudos químicos e biológicos (CANER *et al.*, 2008; LOPES-LUTZ *et al.*, 2008; ABERHAM *et al.*, 2010), o gênero *Artemisia* produz como principais metabólitos, lactonas sesquiterpênicas, as quais são conhecidas por possuírem atividade antimetabólica, além de cumarinas, flavonoides, glicosídeos e poliactilenos, os quais têm ação bacteriostática e fungicida (KENNEDY *et al.*, 1988; TAN; ZHENG; TANG, 1998; TEIXEIRA DA SILVA, 2004).

Espécies do gênero *Artemisia* têm sido amplamente usadas na medicina popular contra diferentes tipos de câncer e tumores. *A. campestris* e *A. vulgaris* são

indicadas popularmente contra tumores de útero, baço, estômago e *A. dracunculus* contra tumores de tendão/nervos (RETHY *et al.*, 2007).

Dentre as espécies deste gênero que são utilizadas na medicina popular, *Artemisia absinthium* (losna) e *Artemisia vulgaris* (artemísia) são bastante conhecidas e comercializadas no Brasil.

### 2.5.3 *Artemisia absinthium*

*Artemisia absinthium* L. é uma planta comumente chamada de losna, losna-maior, erva-dos-vermes, gotas-amargas, absinto, erva-santa. É uma planta subarborescente, de caule piloso, atingindo pouco mais de 1,0 m de altura. As folhas são multifendidas de lóbulos finos, medindo de 7-12 cm de comprimento, com coloração verde-acizentada na face adaxial e esbranquiçada na parte inferior (FOSTER; DUKE, 1999; LORENZI; MATOS, 2008). As flores são minúsculas, amarelas e caem de julho a setembro (FOSTER; DUKE, 1999). Todas as partes da planta têm sabor muito amargo. Esta característica das preparações de *A. absinthium* é devido a presença de lactonas sesquiterpênicas, como por exemplo, a absintina, que é o principal constituinte amargo da erva (ABERHAM *et al.*, 2010).

*A. absinthium* cresce naturalmente em locais pedregosos da Europa, Ásia e norte da África. É cultivada na América do Norte e em alguns países da Europa para preparação de vinhos e licores, bem como no Brasil, onde é mantida em hortas e jardins para atender a seu emprego na medicina caseira (LORENZI; MATOS, 2008). Seu uso médico está documentado no Ebers Papyrus, um documento egípcio que data de 1552 a.C, sendo o mais antigo documento médico preservado (EBBELL<sup>2</sup>, 1937, citado por LACHENMEIER, 2010).

As partes aéreas da planta são usadas na medicina popular como chá, o qual é tradicionalmente indicado para o tratamento de distúrbios da digestão, perda de apetite, como anti-helmíntico, antitumoral, antipirético, para distúrbios do fígado e da vesícula biliar (BLAGOJEVIC *et al.*, 2006; LORENZI; MATOS, 2008). O chá é

---

<sup>2</sup> EBBELL, B. **The Papyrus Ebers: The Greatest Egyptian Medical Document**. London: Oxford University Press, 1937.

preparado com uma colher de chá da erva para uma xícara de água fervente, sob a forma de infusão. Para uso externo, como no caso de pequenos ferimentos e picadas de inseto, o tratamento é feito com o uso de lavagens e compressas locais, com o cozimento (decocto) de uma mão cheia da planta fresca para um litro de água (LORENZI; MATOS, 2008).

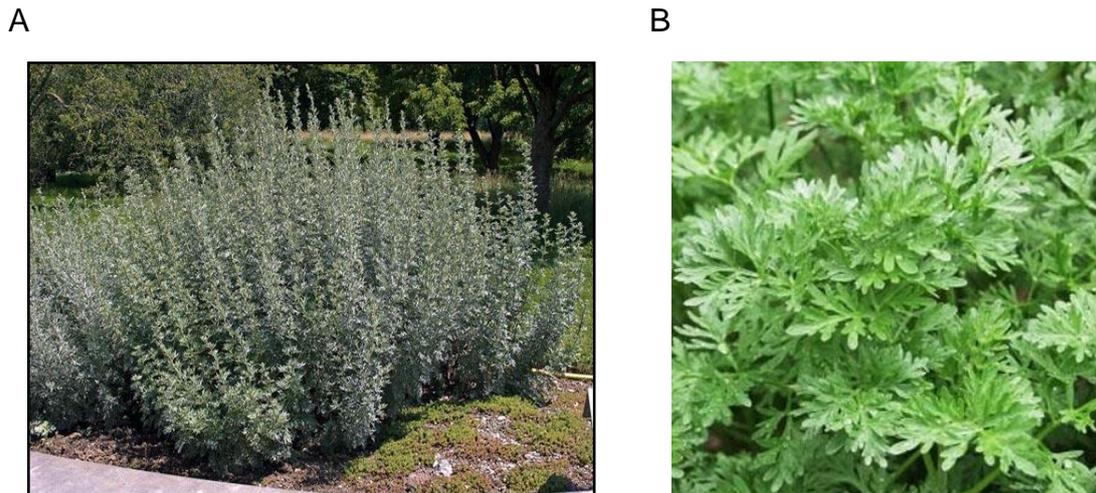


FIGURA 4 – *Artemisia absinthium* E O DETALHE DE SUAS FOLHAS.

FONTE:

A - *A. absinthium* (planta). GARDENS AND PLANTS. COM. Disponível em: <<http://www.gardensandplants.com/images/plants/Artemisia%20absinthium.jpg>>. Acesso em 30/01/2012.

B - Detalhe parte aérea de *A. absinthium*. VIDASUL SEMENTES. Disponível em: <<http://www.vidasul.com/produto.php?id=179>> Acesso em 23/02/2011.

A planta também foi usada na antiguidade por mulheres, sob a forma de compressas, para acelerar o trabalho de parto e por provocar contrações uterinas, como precaução, não deve ser ingerida por mulheres grávidas (MABEY *et al.*, 1988). Esta planta era utilizada para aromatizar a bebida absinto (CANADANOVIC-BRUNET *et al.*, 2005), sendo que o consumo abusivo desta bebida causava distúrbios mentais, incluindo sintomas como alucinações, insônia e convulsões. Estes sintomas foram atribuídos à presença do composto  $\alpha$ -tujona, um monoterpene presente na espécie *A. absinthium* (ARNOLD, 1988). No entanto, atualmente acredita-se que o etanol sozinho foi o responsável pelos sintomas decorrentes do consumo do absinto e que o composto tujona apresentava ou nenhum ou um pequeno papel nos efeitos neurológicos causados pelo absinto (LACHENMEIER *et al.*, 2006).

Tujona é um monoterpreno (figura 5) que ocorre naturalmente como  $\alpha$  e  $\beta$ -diastereoisômeros encontrado no óleo essencial de várias espécies de *Artemisia* (SIVEEN; KUTTAN, 2011). O principal efeito relatado em humanos bem como em modelos animais foi neurotoxicidade, manifestada sob a forma de convulsões epiléticas, sendo o efeito tóxico dose-dependente (LACHENMEIER, 2010). Este efeito é devido ao composto tujona agir como antagonista dos receptores GABA e 5-HT<sub>3</sub> do cérebro (HOLD *et al.*, 2000; DEIML *et al.*, 2004). Dessa forma, a concentração deste composto nas preparações da erva deve ser levada em consideração. A concentração de tujona no óleo essencial de *A. absinthium* é altamente variável (0-71%), bem como a quantidade extraída durante diferentes preparações, como, por exemplo, no chá da planta. No entanto, sabe-se que este componente é menos solúvel em água do que em etanol (TEGTMEIER; HARNISCHFEGGER, 1994).

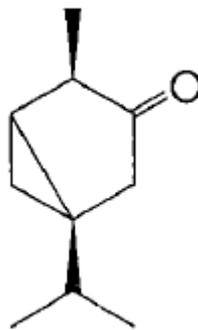


FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO  $\alpha$ -TUJONA.  
 FONTE: HOLD *et al.* (2000).

Apesar de já ter sido comprovado que em altas concentrações o composto  $\alpha$ -tujona apresenta atividade neurotóxica, este composto foi capaz de aumentar a resposta imune humoral e mediada por células *in vivo*. A administração intraperitoneal de tujona (1mg/kg) em camundongos promoveu o aumento no tamanho dos órgãos linfóides, bem como no número de células destes órgãos, indicando ativação da resposta imune por linfócitos. A resposta humoral, dependente da produção de anticorpos, também foi aumentada após administração da droga e permaneceu alta após vários dias do tratamento. O composto também aumentou a atividade das células NK e estimulou a secreção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-2. Estes efeitos sobre a estimulação da resposta imune foi capaz de aumentar o tempo

de vida e reduzir significativamente o desenvolvimento de tumor sólido induzido nos camundongos (SIVEEN; KUTTAN, 2011).

Além do composto tujona, outros metabólitos presentes nesta espécie também têm sido identificados. Aberham *et al.* (2010) avaliaram por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por ressonância magnética nuclear (RMN) diferentes preparações de *A. absinthium* quanto a presença de oito compostos bioativos característicos desta espécie. Os compostos avaliados pertencem às classes das lactonas sesquiterpênicas, lignanas e flavonoides e estão representados na figura 6. As ervas usadas nesse estudo foram adquiridas de diferentes fornecedores e extraídas com diclorometano. Também foram analisados produtos comercialmente disponíveis, como cápsulas e preparações líquidas. Nesse estudo, os autores verificaram que a maioria das amostras testadas apresentava todos os oito compostos, sendo que absintina e iangambina foram os principais constituintes dos extratos.

A composição química do óleo essencial de *A. absinthium* determina o quimiotipo da planta, isto porque o composto majoritário do óleo varia dependendo da origem da planta e também das condições de crescimento e estágio do desenvolvimento (MARTIN *et al.*, 2011). Estudos realizados sobre a composição do óleo essencial de *A. absinthium* cultivada em diferentes países, demonstraram uma composição química muito particular (BLAGOJEVIC *et al.*, 2006; ORHAN *et al.*, 2010; MARTIN *et al.*, 2011).

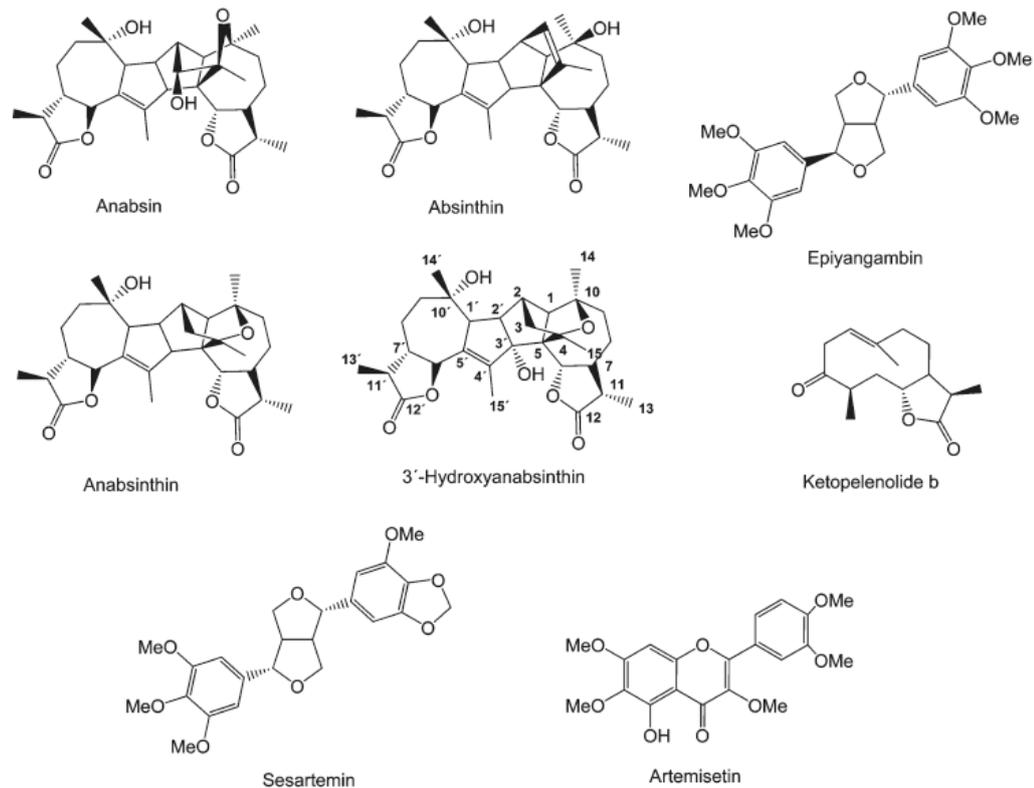


FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS OITO COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM *A. absinthium*, ANALISADOS POR ABERHAM *et al.* (2010).

FONTE: ABERHAM *et al.* (2010).

A variedade de compostos exibida por *A. absinthium* justifica as diferentes atividades biológicas apresentadas pelos extratos da planta. Propriedades antioxidantes de *A. absinthium* foram descritas por Canadanovic-Brunet *et al.* (2005), os quais atribuíram tal propriedade a compostos fenólicos presentes em alta quantidade nos extratos desta planta.

As propriedades hepatoprotetoras descritas popularmente para *A. absinthium* foram confirmadas por Amat, Upur e Blazekovic (2010), os quais testaram extratos da planta em ratos com injúria hepática, ocasionada imunologicamente ou induzida por tetracloreto de carbono. O pré-tratamento dos ratos com o extrato aquoso de *A. absinthium*, protegeu o fígado de injúrias, sendo que o tratamento com 200 mg/kg mostrou atividade comparável ao tratamento com silimarina, uma droga hepatoprotetora usada como referência. Os autores sugerem que o extrato da planta protegeu o fígado contra danos oxidativos e possibilitou a manutenção dos níveis

intracelulares de enzimas antioxidantes, resultando assim na proteção do fígado contra injúria aguda.

Tariq *et al.* (2009) validaram o uso popular do extrato de *A. absinthium* como um agente anti-helmíntico. Os autores testaram o extrato aquoso e etanólico da planta, sobre nematódeos de ovinos *in vivo* e *in vitro*. O índice de mortalidade (MI) dos parasitas expostos ao extrato etanólico foi maior do que aqueles expostos ao extrato aquoso, com MI de 0,95 e 0,75, respectivamente. O tratamento de animais com os extratos de *A. absinthium* reduziu o número de ovos de parasitas nas fezes, sendo o efeito dose-dependente. Dessa forma, extratos de *A. absinthium* apresentam-se como uma alternativa promissora, sustentável e segura para os convencionais anti-helmínticos.

Recentemente foram testados os efeitos de *A. absinthium* em humanos (KREBS; OMER, T.; OMER, B., 2010). O alvo do estudo foram pacientes com doença de Crohn, uma doença auto-imune caracterizada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo a principal envolvida o TNF- $\alpha$ . Os autores escolheram esta planta para o tratamento destes pacientes porque estudos recentes (XU *et al.*, 2007) demonstraram que o composto artemisina, uma lactona sesquiterpênica, presente em espécies do gênero *Artemisia*, pode exercer efeitos anti-inflamatórios, suprimindo citocinas como o TNF- $\alpha$  e outras interleucinas. Para o tratamento da doença de Crohn são utilizados inibidores de TNF- $\alpha$ , mas como são proteínas e precisam ser injetadas no paciente causam uma série de efeitos colaterais, o que justifica a busca por inibidores que sejam administrados oralmente. Krebs, Omer T. e Omer B. (2010) utilizaram a parte aérea de *A. absinthium*, triturada e administrada na forma de cápsulas (sem nenhum processo de extração) em 20 pacientes com doença de Crohn. Após 6 semanas de tratamento com a erva, os níveis de TNF- $\alpha$  no soro diminuíram de 24,5 para 8,0 pg/ml, além de ser observado uma constante melhora nos sintomas da doença. Nenhum efeito colateral foi relatado. De acordo com os autores, somente a supressão de TNF- $\alpha$  não é suficiente para explicar a melhora observada nos pacientes e que, provavelmente, outros efeitos imunomoduladores da erva estejam envolvidos neste processo.

#### 2.5.4 *Artemisia vulgaris*

*Artemisia vulgaris* Linn. é uma planta conhecida popularmente como artemísia, artemígio, artemigem, anador, flor-de-são-joão, absinto-selvagem. É uma planta herbácea perene, rizomatosa, ereta, caule pouco ramificado com 30-60 cm de altura. A planta apresenta folhas pinatífidas, membranáceas, com a face inferior de cor prateada, medindo de 6-16 cm de comprimento e as flores são esbranquiçadas e discretas. É originária da Ásia e naturalizada em quase todo o mundo (LORENZI; MATOS, 2008).

Artemísia é uma erva aromática, utilizada para fins culinários, na preparação de temperos e licor, além de ser bastante conhecida pelo seu uso na medicina popular (SUJATHA; KUMARI, 2008). É reconhecida como analgésica, antiespasmódica, anticonvulsiva, sendo empregada também para dispepsia, epilepsia, dores reumáticas, febres, anemias e para expelir parasitas intestinais. A planta é usada na tradicional medicina europeia para o tratamento de cólicas menstruais e amenorreia (TEIXEIRA DA SILVA, 2004). Como precaução, seu uso também é restringido para mulheres grávidas (MABEY *et al.*, 1988).

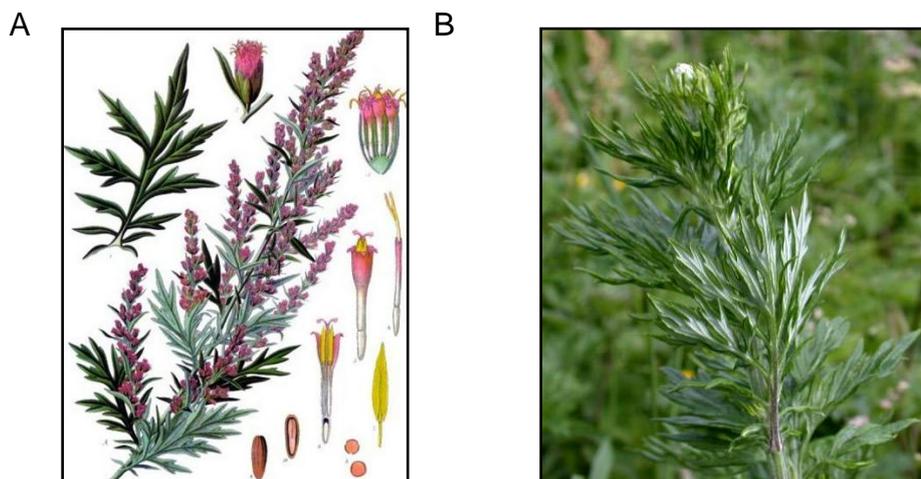


FIGURA 7 – DESENHO BOTÂNICO E PARTE AÉREA DE *Artemisia vulgaris*

FONTE:

A – Desenho botânico de *A. vulgaris*, com detalhe de seus ramos, folhas, frutos, semente. ZANDHOOGTE. Disponível em: <<http://www.zandhoogte.nl/plantenlijst/index.php?act=view&id=56>> Acesso em 24/10/2010.

B – Parte aérea de *A. vulgaris*. FARMER,C. 2003. Disponível em: <<http://www.plant-identification.co.uk / skye/compositae/artemisia-vulgaris.htm>> Acesso em: 24/10/2010.

O óleo essencial de *A. vulgaris* contribui majoritariamente com as propriedades biológicas apresentadas pela erva. Por esta razão, a composição química deste óleo foi investigada por diversos autores (JUDZENTIENE; BUZELYTE, 2006).

De acordo com a literatura, a composição do óleo essencial da parte aérea de plantas de *A. vulgaris* cultivadas na Índia, Sérvia e Lituânia apresentou diferenças entre os componentes principais. Entretanto, os compostos 1,8-cineol e  $\alpha$ -tujona foram identificados em todas as amostras analisadas (HAIDER *et al.*, 2003; JUDZENTIENE; BUZELYTE, 2006; BLAGOJEVIC *et al.*, 2006).

Como as raízes de *A. vulgaris* são também utilizadas como remédio popular, Blagojevic *et al.* (2006) também avaliaram a composição química do óleo essencial das raízes e identificaram como principais componentes (Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienil 2-metilbutanoato,  $\beta$ -eudesmol e 3-metilbutanoato. Nenhum destes compostos foi encontrado na parte aérea, demonstrando as potenciais diferenças nas propriedades biológicas apresentadas pelos diferentes órgãos das plantas. As raízes de *A. vulgaris* também são conhecidas por apresentar inulina (USDA-ARS-NGRL, 2004).

Além das diferenças de composição entre os órgãos das plantas, extratos obtidos pelo uso de diferentes solventes também apresentam composição química e propriedades biológicas diferentes. Para extratos metanólicos de *A. vulgaris* já foram descritas atividades hepatoprotetoras (GILANI *et al.*, 2005), anti-helmínticas (CANER *et al.*, 2008), antiespasmódica e broncodilatadora (KHAN; GILANI, 2009). A atividade hepatoprotetora da erva foi confirmada por Gilani *et al.* (2005) em ratos com hepatite induzida. O pré-tratamento dos animais com o extrato da planta provocou melhora do tecido hepático, diminuindo o inchaço celular e o número de células em apoptose.

A atividade antiespasmódica do extrato metanólico da planta foi avaliada por Khan e Gilani (2009), os quais verificaram que o extrato foi capaz de relaxar contrações musculares de preparações de jejuno de coelho. Os autores também constataram um efeito broncodilatador causado pelo extrato metanólico da planta na traquéia de ratos, o que justifica a indicação desta planta para o tratamento de asma, conforme descrito na medicina popular. Khan e Gilani (2009) concluíram que *A. vulgaris* apresenta um efeito relaxante na musculatura lisa, possivelmente, mediado pela combinação de mecanismos anticolinérgico e antagonista de cálcio. Os autores supõem que o efeito anticolinérgico de *A. vulgaris* pode ser devido aos

alcalóides presentes na planta e o efeito antagonista de cálcio aos flavonoides, compostos conhecidos por possuírem tais atividades.

As espécies *A. vulgaris* e *A. absinthium* foram utilizadas por Caner *et al.* (2008) na avaliação do potencial anti-helmíntico já relatado na literatura informal para estas plantas. O extrato metanólico da parte aérea foi capaz de reduzir a quantidade de larvas de *Trichinella spiralis* em músculo de rato. A espécie *A. vulgaris* foi mais efetiva no combate ao parasita na fase adulta, diminuindo em 65,8% o número de larvas em relação ao controle, enquanto *A. absinthium* diminuiu em 51,9%, utilizando a mesma dose. Além disso, não foi observada toxicidade aguda nos ratos, nas doses administradas.

O extrato hidroalcoólico de *A. vulgaris* foi testado *in vivo* em diferentes testes a fim de confirmar o uso popular desta erva como analgésico, anti-inflamatório e antiespasmódico. O extrato na concentração de 1000 mg/kg inibiu em 59% as contorções abdominais induzidas por ácido acético, mas não apresentou qualquer efeito nos demais testes realizados, sugerindo que o extrato apresenta moderada atividade antinociceptiva periférica (PIRES *et al.*, 2009).

## 2.6 JUSTIFICATIVA

As plantas *Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris* são ervas medicinais facilmente encontradas no Brasil, nos comércios e em jardins e hortas para atender ao seu uso na medicina popular (LORENZI; MATOS, 2008). Estas plantas são indicadas para o tratamento de diversas doenças e seu principal consumo é na forma de chá (infusão). Apesar disso, grande parte dos estudos com estas ervas utilizam extratos metanólicos ou hidroalcoólicos e atribuem as atividades biológicas apresentadas a compostos do óleo essencial ou a outros metabólitos secundários (CANADANOVIC-BRUNET *et al.*, 2005; PIRES *et al.*, 2009; KREBS; OMER T.; OMER B., 2010). No entanto, no chá consumido tradicionalmente, além de compostos de baixa massa também estão presentes moléculas de alta massa molar, dentre as quais estão os polissacarídeos. Até o momento, não foram encontrados dados na literatura sobre os polissacarídeos presentes na parte aérea destas espécies.

Considerando que polissacarídeos extraídos de diferentes fontes vegetais já apresentaram inúmeras propriedades terapêuticas, destacando entre elas a atividade antitumoral (XU *et al.*, 2011; TAPER; ROBERFROID, 1999; WU; LEE, 2011) e que algumas espécies do gênero *Artemisia* já apresentam atividade antiproliferativa sobre alguns tipos de câncer (RETHY *et al.*, 2007; NAWAB *et al.*, 2011), torna-se relevante o estudo dos polissacarídeos das espécies *A. absinthium* e *A. vulgaris* e avaliação da atividade antitumoral destes compostos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar polissacarídeos das folhas de *A. vulgaris* e *A. absinthium* e avaliar o potencial antitumoral dos polissacarídeos e das infusões das ervas sobre as células de leucemia humana THP-1.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter polissacarídeos das folhas de *A. vulgaris* e *A. absinthium* por infusão (chá);
- Analisar as frações obtidas quanto ao teor de açúcar total e proteína;
- Caracterizar as frações quanto à sua composição monossacarídica e homogeneidade;
- Purificar a fração de interesse e caracterizá-la estruturalmente;
- Avaliar o efeito das frações polissacarídicas brutas, das infusões preparadas da forma tradicional e da fração purificada sobre as células THP-1 quanto à viabilidade celular;
- Avaliar o efeito das frações sobre a proliferação das células THP-1;
- Verificar o potencial das frações em induzir a diferenciação das células THP-1 em macrófagos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

A espécie *A. vulgaris* foi cedida gentilmente pelo Laboratório Santos Flora Comércio de Ervas Ltda – SP (Lote ARTER01/0310, fabricação 03/2010).

A espécie *A. absinthium* foi adquirida em loja de produtos naturais, sob o Lote LOSNR01/0109, fabricação 01/2009, da empresa Hubert Comércio de Produtos Alimentícios Ltda (SP).

As plantas foram adquiridas secas e a parte aérea (sem flores) não triturada foi utilizada para extração dos polissacarídeos.

### 4.2 PREPARAÇÃO DO CHÁ (INFUSÃO)

Para reproduzir o chá usado na medicina popular, as ervas secas foram preparadas na forma de infusão, na medida utilizada popularmente (1 colher de chá da erva para 1 xícara de chá de água = 200 ml) como descrita em Lorenzi e Matos (2008). Água fervente foi adicionada sobre as ervas em um recipiente, o qual foi tampado e o sistema mantido nestas condições até amornar (temperatura aproximada 40 °C). Em seguida, o extrato foi filtrado e liofilizado.

### 4.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS POR INFUSÃO

As partes aéreas secas de *A. absinthium* (10 g) e *A. vulgaris* (13 g), sem passar por processo de trituração, foram submetidas à extração por infusão com 2 litros de água destilada fervente. A quantidade de erva para a infusão foi proporcional à usada popularmente, conforme descrito no item 4.2.

Os extratos foram em seguida filtrados, concentrados em rotaevaporador e precipitados com 4 volumes de etanol para obtenção dos polissacarídeos. A solução foi mantida em geladeira durante a noite e centrifugada no dia seguinte a 8000 rpm, por 20 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol e seco em estufa a vácuo. Foram realizadas várias extrações para obtenção de quantidade suficiente de amostra para realização dos experimentos. Os polissacarídeos obtidos das infusões foram reunidos em uma fração única. A fração polissacarídica bruta obtida da espécie *A. absinthium* foi denominada API e da espécie *A. vulgaris* (VPI).

#### 4.4 PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO OBTIDO POR INFUSÃO DE *A. absinthium*

Os polissacarídeos obtidos por precipitação etanólica da infusão da parte aérea de *A. absinthium* (API) foram purificados utilizando os métodos descritos a seguir.

##### 4.4.1 Diálise fechada

A amostra bruta (API) foi inicialmente submetida à diálise fechada contra água destilada em membrana com limite de exclusão de 12.000 Da, durante 48 horas. Em seguida, a amostra retida na membrana de diálise e o material dialisável em membrana foram concentrados em rotaevaporador, congelados e liofilizados.

##### 4.4.2 Fracionamento por congelamento e degelo

A amostra retida na membrana de diálise (API-DI) foi submetida a fracionamento por congelamento e degelo. Após solubilizar a amostra em água destilada, esta foi congelada e em seguida, descongelada a temperatura ambiente.

O material não solúvel em água fria (API-IS) foi separado do sobrenadante solúvel (API-S) por centrifugação (15.000 rpm, 10 min, 5 °C). O processo foi repetido até que não houvesse mais formação de precipitado insolúvel no processo de congelamento/degelo.

#### 4.4.3 Remoção enzimática do amido

A fração solúvel em água fria de *A. absinthium* (API-S) foi submetida a remoção enzimática do amido. A amostra foi solubilizada na concentração de 10 mg/ml em tampão fosfato 20 mmol/l, pH 6,9 contendo 6,7 mmol/l de NaCl. Foram utilizadas as enzimas amiloglucosidase (Megazyme) e  $\alpha$ -amilase termoestável (Sigma), na concentração de 0,3 unidades/ml de amiloglucosidase e 0,09  $\mu$ l de  $\alpha$ -amilase por ml de solução de polissacarídeo. A reação foi mantida sob agitação durante 20 horas à 55 °C. Posteriormente, a enzima foi inativada por fervura durante 15 minutos, o material centrifugado e o resíduo contendo as enzimas desnaturadas foi descartado. O sobrenadante foi precipitado com quatro volumes de etanol e mantido sob refrigeração durante a noite. O material foi em seguida centrifugado, o resíduo lavado com etanol, ressolubilizado e dialisado por 48 horas em membrana com limite de exclusão de 12000 Da. Após nova precipitação, a amostra livre de amido (API-AM) foi centrifugada, lavada três vezes com etanol e seca em estufa a vácuo.

#### 4.4.4 Fracionamento por filtração

Após remoção enzimática do amido, a fração API-AM foi submetida a ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 30 kDa (Millipore). A amostra foi filtrada por um sistema de filtração acoplado a um cilindro de ar comprimido. Em seguida, as amostras eluída (API-EL) e retida na membrana (API-RT) foram congeladas e liofilizadas.

Após este processo a amostra eluída (API-EL) foi filtrada em membrana de 0,1  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

### 4.5.1 Composição monossacarídica

A composição monossacarídica das frações obtidas foi determinada após hidrólise dos polissacarídeos com TFA 2 mol/l, por 5 horas em banho fervente. Após a hidrólise, o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN; McGINNIS, 1989).

### 4.5.2 Redução, acetilação e extração dos produtos acetilados

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram dissolvidos em água destilada e reduzidos com  $\text{NaBH}_4$  por aproximadamente 16 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Após redução, o material foi tratado com resina catiônica para decomposição do excesso do agente redutor e remoção do sódio. Em seguida, o material foi filtrado e evaporado até a secura. Foram realizadas três lavagens com metanol para remoção do boro residual, na forma de borato de trimetila. Após completa secura, os alditóis foram acetilados com anidrido acético e piridina na proporção de 1:1 (v/v), por aproximadamente 1 hora em estufa a 100 °C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). O processo de acetilação foi interrompido pela adição de gelo moído e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi removida por sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% e água destilada de forma intercalada. A fase clorofórmica foi lavada diversas vezes com água destilada e evaporada a temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

#### 4.5.3 Hidrólise da frutana

A infusão de *A. vulgaris* (VI) e a fração polissacarídica bruta obtida por precipitação etanólica da infusão desta espécie (VPI), na concentração de 5 mg/ml, foram hidrolisadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mmol/l (pH 2), em banho-maria fervente, por 15 minutos. Após hidrólise, a solução foi neutralizada com carbonato de bário e em seguida, as amostras foram filtradas para remoção do sal insolúvel formado. Para verificar a presença de frutose nas amostras, estas foram ressolubilizadas em água ultrapura e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em camada delgada.

#### 4.5.4 Análise da homogeneidade

Para análise da homogeneidade as amostras foram solubilizadas em solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 mol/l contendo 200 ppm de NaN<sub>3</sub> para obter concentração polissacarídica final de 1 mg/ml. Em seguida, as soluções foram filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,22 µm e analisadas por cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC).

#### 4.5.5 Determinação do $dn/dc$ e cálculo da massa molar

A taxa de variação do índice de refração com a concentração ( $dn/dc$ ) foi determinada para a fração pura (API-F1), obtida após os processos de purificação da fração polissacarídica bruta proveniente da infusão de *A. absinthium*. Para isto, foi preparada uma solução do polissacarídeo na concentração de 1 mg/ml em NaNO<sub>2</sub> 0,1 mol/l contendo 200 ppm de NaN<sub>3</sub>, a qual foi filtrada em membrana de 0,22 µm, sendo posteriormente diluída para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg/ml. As amostras foram analisadas por HPSEC, utilizando-se apenas o detector

de índice de refração. Os cálculos para determinação do  $dn/dc$  foram realizados utilizando o software Astra.

A massa molar do polissacarídeo API-F1 foi determinada a partir do gráfico da homogeneidade da amostra e do valor de  $dn/dc$  calculado, através do software Astra.

#### 4.5.6 Carboxi-redução

Os grupos carboxílicos provenientes dos ácidos urônicos da fração API-F1 foram reduzidos às suas correspondentes unidades glicosídicas neutras pelo método de Taylor e Conrad (1972) modificado por Stone e Anderson (1985). A fração (80 mg) foi solubilizada em 8 ml de tampão MES 0,2 mol/l (ácido 2-(*N*-morfolina)-etanossulfônico), pH 4,75. A seguir, adicionou-se, aos poucos e sob agitação 163,7 mg de 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida metap-toluenossulfonato (CMC). A solução permaneceu por uma hora sob agitação e então adicionou-se tampão TRIS 2 mol/l (ácido *N*-tris[hidroximetil]metil-2-aminioetano sulfônico), pH 7,0, até estabilização do pH da solução em 7,0. Posteriormente, acrescentou-se NaBH<sub>4</sub> aos poucos, sob agitação, na presença de octanol, até concentração final de 2 mol/l. A mistura permaneceu sob agitação durante a noite e a redução foi interrompida pela adição de ácido acético 50% até pH 5,4. O material foi submetido à diálise contra água destilada, NaCl 0,5 mol/l e água ultrapura, respectivamente, utilizando membranas com limite de exclusão de 12000 Da, durante 72 horas, e em seguida, congelado e liofilizado.

A fração carboxi-reduzida obtida foi denominada API-CX, e após hidrólise e derivatização, conforme descrito nos itens 4.5.1. e 4.5.2, foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-MS).

#### 4.5.7 Metilação

A fração API-F1 foi metilada pelo método descrito por Kvernheim (1987). O polissacarídeo (2 mg) foi seco durante a noite em pistola a vácuo contendo  $P_2O_5$ . Sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado 400  $\mu$ l de DMSO e a amostra foi mantida a 50 °C por 2 horas sob agitação magnética. Em seguida, a amostra foi resfriada a temperatura ambiente e adicionado 100  $\mu$ l de butil-lítio (15% em hexano). A solução foi aquecida a 40 °C e mantida sob agitação por 1 hora. Após este tempo, a amostra foi resfriada em banho de gelo até congelar e adicionado 200  $\mu$ l de iodeto de metila. A mistura foi deixada descongelar e agitada por 1 hora a temperatura ambiente. A extração do metilado foi realizada pelo método de Harris *et al.* (1984), utilizando 3 ml de clorofórmio:metanol (2:1), a mistura foi agitada e em seguida, foi adicionado 2 ml de água destilada. A fase clorofórmica foi lavada mais três vezes com água destilada e evaporada sob banho (90 °C). O processo de metilação foi repetido mais uma vez e em seguida, o material metilado foi hidrolisado com 1,0 ml de ácido fórmico 90% sob banho fervente por 1 hora. Após isso, foi adicionado 1,0 ml de TFA 2 mol/l e a amostra permaneceu por mais 2 horas em banho fervente. O ácido foi evaporado a temperatura ambiente e o metilado foi ressuspenso em água destilada, reduzido com  $NaBH_4$  e acetilado conforme descrito no item 4.5.2. Após derivatização, os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS).

#### 4.5.8 Oxidação com periodato de sódio

Em uma solução aquosa a 10 mg/ml do polissacarídeo API-F1, foi adicionado o agente oxidante metaperiodato de sódio ( $NaIO_4$ ) para uma concentração final de 0,05 mol/l. A solução permaneceu durante 72 horas no escuro, sob agitação magnética, a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de etilenoglicol, sendo posteriormente dialisada contra água corrente durante 48 horas. A fração foi, então, reduzida com  $NaBH_4$  (pH 10,0) durante a noite. Em seguida, a solução foi neutralizada com ácido acético e posteriormente dialisada contra água

corrente por mais 48 horas. O poliálcool resultante (API-OPE) foi submetido a análise de composição monossacarídica.

#### 4.5.9 Polarimetria

As análises de rotação óptica foram efetuadas em polarímetro digital PDA 8200-ACATEC, em lâmpada de halogênio com filamento de tungstênio, filtro de 589 nm e caminho óptico de 1,0 dm. A amostra purificada (API-F1) foi solubilizada em água em uma concentração de 0,3% (m/v). Os valores experimentais do ângulo de desvio da luz plano polarizada  $\alpha$ , fornecidos pelo aparelho, foram utilizados para o cálculo da rotação óptica específica dos polissacarídeos,  $[\alpha]_D^{25}$  das soluções conforme a equação:  $[\alpha]_D^{25} = \alpha \times 100/L \cdot c$ , onde: L corresponde ao comprimento do caminho óptico (dm) e c a concentração da solução.

### 4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 4.6.1 Métodos cromatográficos

##### 4.6.1.1 Cromatografia líquido-gasosa (GLC)

A cromatografia líquido-gasosa (GLC) foi realizada em um cromatógrafo THERMO Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização em chama, utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 ml/min. Uma coluna capilar de sílica fundida DB-225 [30 m x 0,25 mm (d.i.)] foi usada.

#### 4.6.1.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-MS)

A cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS) foi realizada em um 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 parcialmente metilados foram analisados por este equipamento a uma temperatura de 50 - 210 °C (40 °C/min).

#### 4.6.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises de HPLC foram realizadas em equipamento Shimadzu equipado com: unidade de controle CBM-10A, forno CTO-10A, bomba LC-10AD e detector de índice de refração RID-10A. Foi utilizada uma coluna Supelcogel Pb, 30 cm x 7,8 mm e as análises foram realizadas a 80 °C e fluxo de 0,5 ml/min. A fase móvel utilizada foi água ultrapura filtrada em membrana de acetato celulose com porosidade de 0,22 µm e sonicada. Foi utilizado como padrão uma solução de frutose, solubilizada a 1 mg/ml em água ultrapura e filtrada em membrana de 0,22 µm. As amostras VI e VPI hidrolisadas e posteriormente neutralizadas, foram ressolubilizadas em água ultrapura e filtradas em membrana de 0,22 µm.

#### 4.6.1.4 Cromatografia em camada delgada

Para verificar a presença de frutose na infusão e na fração polissacarídica bruta da infusão obtidas de *A. vulgaris* foi realizada uma cromatografia em camada delgada conforme descrito por Sims, Cairns e Furneaux (2001). Foi utilizada como fase estacionária uma placa de sílica Gel (Macherey-Nagel). A placa foi desenvolvida três vezes em 1-butanol/2-propanol/H<sub>2</sub>O na proporção de 3:12:4 (v/v/v)

a temperatura ambiente. Os monossacarídeos foram visualizados utilizando reagente uréia-ácido fosfórico (WISE *et al.*, 1955), específico para cetoses. Em seguida, a placa foi aquecida em estufa a 105 °C por 30 minutos.

#### 4.6.1.5 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detecção por espalhamento de laser multiângulos, índice de refração e ultravioleta (HPSEC-MALLS/RI/UV)

As análises de homogeneidade e determinação da massa molar foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com detector de índice de refração (RI) diferencial WATERS modelo 2410, detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP, com 18 canais acoplados em série e um detector de ultravioleta Pharmacia LKB Uvicord VW 2251 no comprimento de onda de 280 nm. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  g/mol. O eluente utilizado foi uma solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 mol/l contendo  $\text{NaN}_3$  200 ppm a 25 °C, com fluxo de 0,6 ml/min, pressão de 920 psi, monitorados por bomba peristáltica WATERS 515.

#### 4.6.2 Métodos espectroscópicos

##### 4.6.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os polissacarídeos foram solubilizados em  $\text{D}_2\text{O}$  e as análises efetuadas em tubos de 5 mm de diâmetro. As determinações de RMN foram realizadas no aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400 acoplado a um transformador Fourier, com ressonância de  $^{13}\text{C}$  de 100 MHz, utilizando a temperatura de 50 °C ou 70 °C. Os deslocamentos foram expressos em ppm, utilizando a ressonância dos grupos  $\text{CH}_3$  da acetona como padrão interno ( $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  30.2).

#### 4.6.2.2 Espectroscopia de infravermelho

As amostras foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (FT-IR - Fourier transform-infrared), em espectrofotômetro BOMEM MB-100 (Hartman & Braun, Canadá). Os espectros foram coletados no modo de absorbância na frequência de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , numa resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , 32 scans, empregando amostras sólidas pulverizadas. Foram preparadas pastilhas usando 2 mg de polissacarídeo para 148 mg de brometo de potássio (KBr) de grau espectroscópico. Como branco utilizou-se uma pastilha de KBr. Antes da preparação das pastilhas, o KBr foi desidratado a 120 °C durante 24 horas e as amostras secas com  $\text{P}_2\text{O}_5$  sob vácuo.

#### 4.6.3 Métodos espectrofotométricos

##### 4.6.3.1 Dosagem de açúcar total

O teor de carboidrato nas amostras foi quantificado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) usando padrão de galactose em concentrações de 20-100  $\mu\text{g/ml}$  e leitura realizada em comprimento de onda de 490 nm.

##### 4.6.3.2 Dosagem de proteína

As dosagens de proteína foram realizadas pelo método de Bradford (1976) usando padrão de albumina bovina nas concentrações de 1-50  $\mu\text{g/ml}$  e leitura realizada em comprimento de onda de 595 nm.

##### 4.6.3.3 Dosagem de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos nas amostras foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, adaptado de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos

(1999). O padrão utilizado foi o ácido gálico nas concentrações de 5-100 µg/ml e a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm.

#### 4.6.3.4 Dosagem de ácidos urônicos

Os ácidos urônicos foram dosados pelo método do m-hidroxibifenil, desenvolvido por Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), utilizando como padrão ácido galacturônico nas concentrações de 5-100 µg/ml e leitura realizada em comprimento de onda de 520 nm.

#### 4.6.3.5 Dosagem de frutose

A proporção de frutose livre e combinada nas amostras obtidas de *A. vulgaris* foi quantificada por uma modificação do método da antrona (POLLOCK, 1982) descrito primeiramente por Jermyn (1956). As amostras foram agitadas com o reagente antrona (0,2% de antrona em ácido sulfúrico 76% v/v) e após 10 minutos em banho a 37 °C, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm. Como padrão foi utilizada solução de inulina nas concentrações de 20-100 µg/ml.

### 4.7 SOLUÇÕES E PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*

Os experimentos de atividade biológica foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular e Oxidações Biológicas. Desta forma os meios de cultura de células e demais soluções utilizados nestes experimentos foram preparados de acordo com os procedimentos de rotina do Laboratório.

#### 4.7.1 Soluções e meio de cultivo

#### 4.7.1.1 Solução salina tamponada

A solução salina tamponada (PBS) em pH 7,4, foi preparada como solução estoque cinco vezes concentrada, sendo constituída por:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40,5 mmol/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7,3 mmol/l e NaCl 680 mmol/l. Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C por 30 minutos e armazenada a 4 °C. Para o uso, a solução foi diluída com água ultrapura estéril.

#### 4.7.1.2 Solução salina balanceada de Hank

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) (HANKS; WALLACE, 1949) foi preparada através da mistura de duas soluções A e B, as quais foram preparadas na forma de soluções estoque em concentração vinte vezes superior. A solução é constituída por NaCl 2,7 mol/l, KCl 104 mmol/l,  $\text{CaCl}_2$  19,7 mmol/l e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16,2 mmol/l e a solução B por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,4 mmol/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  8,7 mmol/l e glucose 100 mmol/l. As duas soluções são misturadas e diluídas com água e seu pH ajustado para 7,4. A solução resultante foi esterilizada por filtração.

#### 4.7.1.3 Solução de Bouin

A solução de Bouin foi preparada na proporção de 15:5:1 de ácido pícrico, formaldeído e ácido acético, sendo que o ácido acético foi adicionado à solução somente no momento do experimento.

#### 4.7.1.4 Meio de cultivo

O meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), utilizado para cultura das células, foi reconstituído em água ultrapura e esterilizado por filtração sob

pressão com membrana de acetato de celulose estéril com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina e o pH ajustado a 7,4 com solução estéril de bicarbonato de sódio a 0,1 mol/l. Posteriormente, foi estocado sob refrigeração.

#### 4.7.2 Linhagem celular e cultivo

A linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (THP-1) utilizada nos experimentos biológicos *in vitro*, foi adquirida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) em 04/05/2011 (Lote 000125). A linhagem foi mantida em meio RPMI 1640, a 37 °C sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### 4.7.3 Preparo das soluções dos polissacarídeos e das infusões para avaliação da atividade biológica

Para os testes de atividade biológica, os polissacarídeos e as infusões foram solubilizados em água ultrapura e esterilizados por filtração em membrana de acetato celulose estéril com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Em seguida, as soluções foram diluídas em meio RPMI para as concentrações adequadas para cada experimento. A quantidade de açúcar total das amostras antes e depois de filtradas foi quantificada pelo método de Dubois *et al.* (1956) e não foi verificada perda de material ocasionada pela filtração.

#### 4.7.4 Células THP-1 diferenciadas (macrófagos)

##### 4.7.4.1 Indução da diferenciação celular

Para promover a diferenciação das células THP-1 de monócitos para macrófagos foi utilizado como agente indutor o éster de forbol – PMA. O protocolo de diferenciação foi adaptado de Daigneault *et al.* (2010).

Inicialmente os monócitos foram plaqueados na densidade celular de  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços, já em contato com o agente indutor (PMA) diluído no meio RPMI na concentração de 200 nmol/l. Após dois dias de exposição ao indutor, o meio foi removido e foram realizadas duas lavagens usando meio livre de PMA. As células aderentes foram incubadas por mais dois dias, com trocas diárias do meio para remoção total do agente indutor. Após este período, as células THP-1 diferenciadas (THP-1d) foram expostas aos tratamentos ou ao controle.

#### 4.7.4.2 Avaliação da viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados a fim de determinar as concentrações adequadas dos polissacarídeos e das infusões que seriam utilizadas nos experimentos posteriores. Estes ensaios foram realizados sobre as células THP-1 diferenciadas (THP-1d), conforme descrito no item 4.7.4, as quais aderem na placa e facilita a avaliação da viabilidade celular pelos métodos do MTT e cristal violeta.

##### 4.7.4.2.1 Método do MTT

O método do MTT (REILLY *et al.*, 1998) é um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade das células através de sua atividade metabólica. Este ensaio se baseia na redução do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio), o qual apresenta coloração amarela, a cristais de formazan que possuem coloração púrpura. A redução do MTT é realizada por desidrogenases mitocondriais que só estão ativas em células viáveis.

As células foram plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços. Após o processo de indução da diferenciação, as células aderentes foram lavadas com PBS e tratadas com as infusões, com os polissacarídeos brutos das duas espécies e também com o polissacarídeo purificado de *Artemisia absinthium* (API-F1). As concentrações utilizadas no ensaio foram de 25, 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$  para todos os compostos testados e as células foram incubadas a

37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas. Em seguida, a viabilidade das células foi determinada pelo método do MTT (REILLY *et al.*, 1998)

Após 48 horas do tratamento das células THP-1d com os compostos e com o controle (meio), o sobrenadante foi descartado e realizada uma lavagem com PBS. Em seguida foi adicionada a solução de MTT (0,5 mg/ml) em HBSS preparada no dia do experimento. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, a solução de MTT foi retirada e adicionou-se DMSO para solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada em leitor de microplaca Epoch BioTek a 550 nm. A intensidade de coloração é proporcional ao número de células viáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle considerado como 100%.

#### 4.7.4.2.2 Cristal Violeta

O método do cristal violeta (KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989) avalia a viabilidade celular através da coloração dos ácidos nucleicos das células aderidas na placa, as quais são consideradas viáveis.

Para este ensaio as células foram plaqueadas e diferenciadas da mesma forma do ensaio do MTT e após 48 horas do tratamento das células com os compostos e com o controle, o sobrenadante foi removido e realizada uma lavagem com PBS. As células aderidas foram fixadas com metanol por 5 minutos e em seguida coradas com solução de cristal violeta 0,2% em etanol 2% por 5 minutos. O excesso de corante foi removido por lavagens sucessivas com PBS e em seguida o cristal violeta absorvido pelo núcleo das células foi dissolvido em solução de citrato de sódio 0,05 mol/l em etanol 50%. Após 10 minutos foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle considerado como 100%.

#### 4.7.4.3 Análise da morfologia celular

Para avaliar se as infusões das plantas *A. vulgaris* e *A. absinthium* promovem alterações morfológicas nas células THP-1d foi realizado um ensaio de morfologia celular. Neste ensaio, as células THP-1 foram plaqueadas na concentração de  $4 \times 10^5$  células/poço, já em contato com o agente indutor da diferenciação – PMA (200 nmol/l). Foram utilizadas placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de vidro estéreis. Após dois dias em contato com o agente indutor, o meio das células foi removido e foram realizadas duas lavagens usando meio livre de PMA. As células aderentes foram incubadas com as infusões nas concentrações de 250 e 500 µg/ml, com LPS (100 ng/ml) como controle positivo e somente com o meio RPMI como controle positivo. Após 48 horas de incubação o sobrenadante foi removido e as lamínulas lavadas duas vezes com PBS. Para a observação das lamínulas em microscopia óptica, as células foram fixadas em solução de Bouin por cinco minutos, lavadas duas vezes com álcool 70% e em seguida com água ultrapura. As lamínulas foram então coradas usando a técnica da Hematoxilina-Eosina. Inicialmente as lamínulas foram imersas na hematoxilina por 90 segundos e em seguida lavadas em água corrente por 10 minutos. Após este tempo, as lamínulas foram imersas na eosina por 30 segundos e lavadas com álcool 70%. Após este processo, as lamínulas foram submetidas à desidratação por imersão em soluções de acetona e xilol em diferentes proporções. Em seguida as lamínulas foram montadas com Entellan® (MERCK) e fotografadas em microscópio Olympus BX40 com câmera de captura DP071 acoplada.

#### 4.7.5 Células THP-1 não-diferenciadas (monócitos)

##### 4.7.5.1 Ensaio de viabilidade celular por azul de tripan

Após determinação das concentrações dos polissacarídeos e das infusões escolhidas a partir dos métodos do MTT e do cristal violeta, a toxicidade dos

compostos também foi avaliada sobre as células THP-1 não-diferenciadas (monócitos) utilizando o ensaio do azul de tripan.

As células foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços, já em contato com os tratamentos, nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$ , e com o controle (somente meio). Após 120 horas do tratamento, as células foram coletadas, centrifugadas a 2000 rpm por 12 minutos e ressuspensas em meio. Foi adicionado a esta suspensão 10% do corante de exclusão azul de tripan (0,4% em PBS) o qual penetra no interior das células que perderam a integridade da membrana (inviáveis) e assim desenvolvem coloração azul.

O número de células viáveis e não viáveis foi contado em câmara de Neubauer sob microscópio óptico e a porcentagem de células viáveis foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % células viáveis =  $n^\circ$  de células não-coradas (vivas) /  $n^\circ$  total de células contadas (coradas e não coradas)  $\times 100$ .

#### 4.7.5.2 Avaliação da atividade antitumoral

Os ensaios para avaliar a ação antitumoral dos compostos foram realizados sobre as células de leucemia humana (THP-1) não-diferenciadas (monócitos), as quais foram mantidas sem estimulação por PMA.

##### 4.7.5.2.1 Ensaio de indução da diferenciação

As frações polissacarídicas e as infusões das ervas foram avaliados quanto a capacidade de interferir na diferenciação das células THP-1. Para isto, as células foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços, já em contato com os tratamentos e com o controle positivo (PMA) e negativo (somente o meio RPMI) (Adaptado de WU; LEE, 2011). As células foram incubadas por 5 dias e após este tempo, a análise da indução da diferenciação celular foi realizada por meio da observação morfológica das células em microscópio invertido Axiovert 40 CFL. As imagens foram capturadas com a câmera Axio Cam, acoplada ao

microscópio, no aumento de 200x. As fotos apresentadas nos resultados são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

#### 4.7.5.2.2 Ensaio de proliferação celular

O efeito antiproliferativo dos polissacarídeos e das infusões obtidas das plantas foi avaliado sobre as células de leucemia (THP-1) utilizando ensaio de proliferação celular. As células foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços. As células foram plaqueadas já em contato com os tratamentos e com o controle - somente o meio RPMI. Após os tempos de 24, 48, 72 e 120 horas as células foram coletadas, centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI. O número de células viáveis foi contado em câmara de Neubauer utilizando o corante vital azul de tripan.

#### 4.7.5.2.3 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Para este ensaio as células THP-1 foram plaqueadas já em contato com os tratamentos ou com o controle (meio RPMI), na densidade de  $5 \times 10^5$  células/placa em placas de 60 mm de diâmetro. Neste ensaio só foram utilizados como tratamento os compostos que apresentaram capacidade de reduzir a proliferação das células THP-1. Após 48 horas em contato com o tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas a 3000 rpm, 5 minutos a 4 °C. O meio foi descartado e em seguida foram realizadas duas lavagens com PBS. As células foram coradas com iodeto de propídeo suplementado com 0,1% de RNase, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100, preparados em PBS, sendo em seguida incubadas no escuro a 4 °C por 30 minutos. As amostras foram analisadas no equipamento FACScalibur (BD) e os 10.000 eventos foram adquiridos usando como filtro de fluorescência FL2. A porcentagem de células nas fases sub-G1, G1 e G2/M foi obtida usando um histograma (eixo X: filtro FL2, eixo Y: números de eventos) pelo *software* WinMDI version 2.9 (desenvolvido por Joseph Trotter, disponível na Web).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism versão 5.00 (San Diego, California, USA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos ao menos três vezes em dias diferentes. Exceto na análise de ciclo celular, experimento que foi realizado em duplicata. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos de tratamento foram comparados a um controle apropriado e a diferença estatística dos valores de média entre os grupos foi avaliada por *One-Way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 *Artemisia absinthium*

#### 5.1.1 Obtenção e caracterização da infusão

A infusão da parte aérea da planta *A. absinthium* foi preparada conforme descrito na literatura popular (LORENZI; MATOS, 2008) a fim de reproduzir o chá consumido. A infusão de *A. absinthium* foi denominada AI (absinthium infusão) e apresentou um rendimento de 19% em relação à massa seca da erva. O rendimento obtido é semelhante ao descrito para a infusão da parte aérea de *Ballota nigra* cujo rendimento foi de 24,4% de material liofilizado em relação à massa seca de ervas usada na preparação da infusão (VRCHOVSKA *et al.*, 2007).

Considerando o rendimento de material liofilizado a partir da infusão, é possível estimar que a cada xícara de chá consumida (200 ml) são ingeridas cerca de 190 mg do material liofilizado, equivalente a 950 µg/ml. Este valor foi utilizado para delimitar as doses utilizadas nos ensaios *in vitro* com as células THP-1.

A infusão de *A. absinthium* foi analisada quanto ao teor de açúcar total, proteína e compostos fenólicos. A amostra AI apresentou um baixo conteúdo de proteína ( $2,7 \pm 0,18$ ) e carboidratos ( $9,2\% \pm 0,53$ ). A quantidade de compostos fenólicos encontrada na amostra ( $3,7\% \pm 0,15$ ) foi menor que a encontrada por Amat, Upur e Blazekovi (2010), os quais quantificaram 6,15% de ácidos fenólicos em uma preparação aquosa de *A. absinthium*. Provavelmente, esta maior quantidade de compostos fenólicos encontrada se deve à forma de preparação exaustiva usada por estes autores (maceração das ervas em água por 12 horas a 25 °C, seguida de fervura por 1 hora).

A amostra AI foi analisada quanto a sua homogeneidade por HPSEC (figura 8) e apresentou perfil de eluição polimodal, devido a presença de diversos componentes indicados pelo detector do índice de refração, o qual fornece um sinal proporcional à concentração. É possível notar que as moléculas que compõem a

infusão são predominantemente de baixa massa molar, pois apresentaram um alto tempo de eluição.

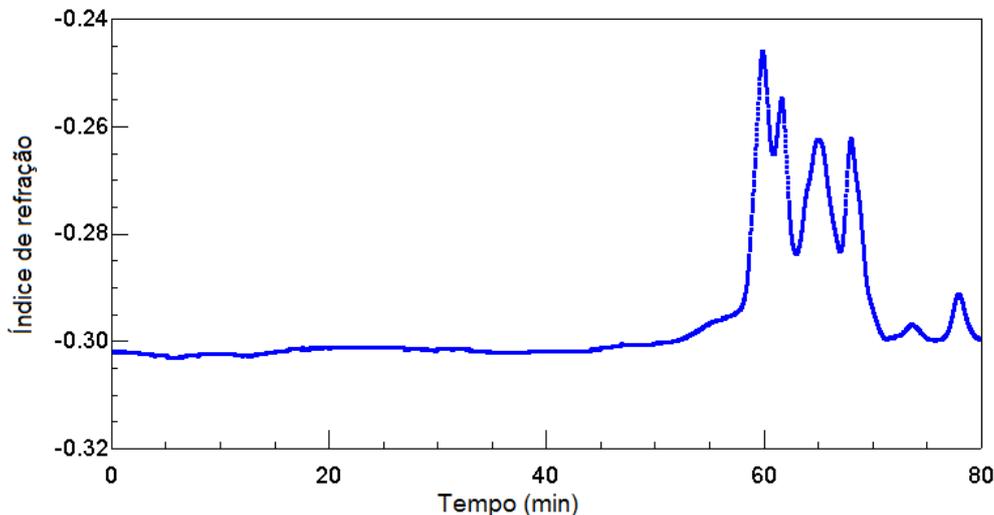


FIGURA 8 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO SOMENTE DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium* (AI).  
FONTE: O autor (2012)

O espectro de RMN-  $^{13}\text{C}$  da infusão de *A. absinthium* (AI) está apresentado na figura 9. Devido à alta complexidade do extrato, somente foram indicados no espectro os principais grupos funcionais relacionados ao carbono, como grupos alquila (0 a 45 ppm), carboidratos (60 a 94 ppm) e compostos fenólicos (144 a 160 ppm) (MATHERS *et al.*, 2003). Apesar da baixa quantidade de carboidratos na amostra (9,2%), a região do espectro de RMN referente aos carboidratos abrange a maioria dos sinais encontrados.

No espectro ainda foi possível localizar sinais correspondentes à região de fenólicos, os quais já foram descritos para a espécie *A. absinthium*, sendo os principais constituintes o ácido clorogênico, cumárico, siríngico, salicílico e vanílico (BORA; SHARMA, 2011). Diversos flavonoides, como a quercetina, têm sido isoladas da parte aérea de *A. absinthium*, assim como flavonóis glicosídeos, como a rutina e derivados da isoramnetina, patuletina e derivados espinacetina (HOFFMANN; HERRMANN<sup>3</sup>, 1982 citado por AMAT, UPUR, BLAZEKOVI, 2010). As

<sup>3</sup> HOFFMANN, B.; HERRMANN, K. Flavonol glycosides of mugwort (*Artemisia vulgaris*), tarragon (*Artemisia dranunculus*) and absinthe (*Artemisia absinthium*). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, v. 174, p. 211–215, 1982.

atividades antioxidantes de extratos de *A. absinthium*, têm sido atribuídas principalmente aos compostos fenólicos, os quais estão provavelmente envolvidos na atividade sequestradora de radicais livres (AMAT; UPUR; BLAZEKOVI, 2010; BORA; SHARMA, 2011).

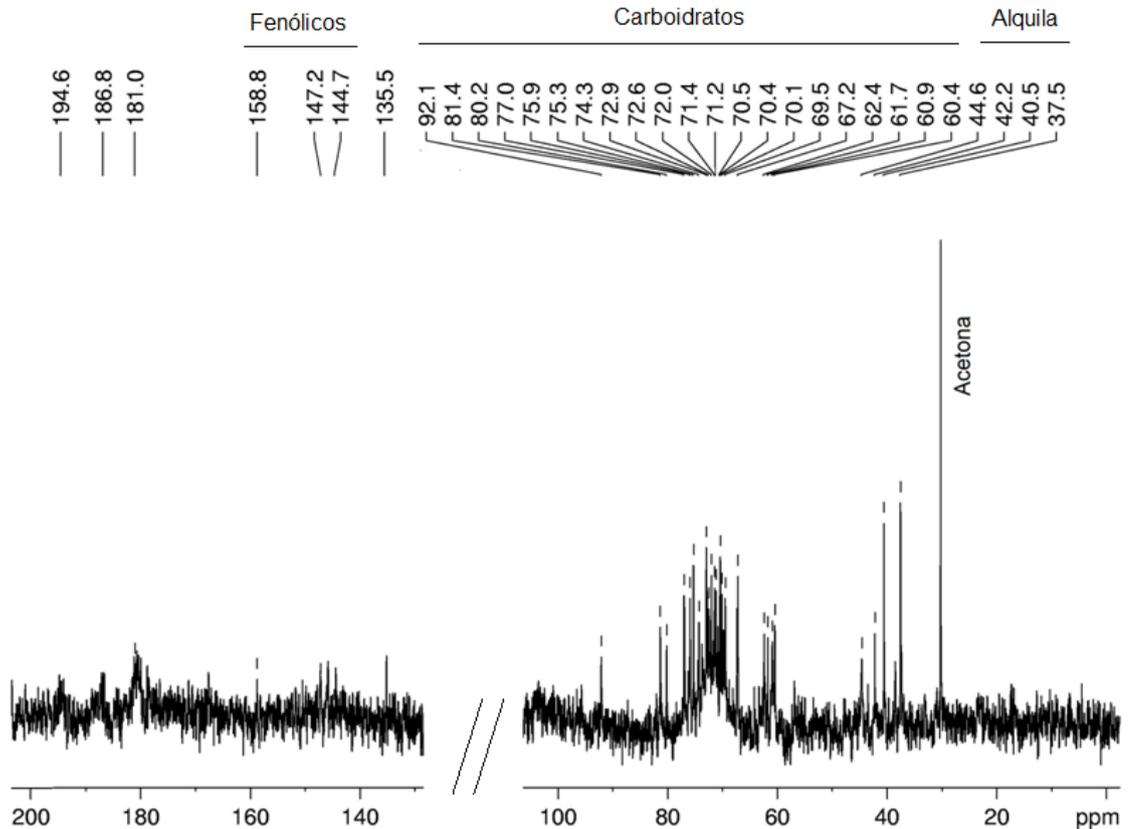


FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium* (AI). EXPERIMENTO REALIZADO EM D<sub>2</sub>O A 50 °C. FONTE: O autor (2012)

Outros compostos químicos também já foram descritos como constituintes de preparações de *A. absinthium*. A composição do óleo essencial desta espécie é bastante variada e depende da origem da planta, destacando compostos como camazuleno, cânfora, 4-terpineol, linalol e borneol (ORHAN *et al.*, 2010). O composto tujona, para o qual já foram descritas atividades neuroprotetora (BORA; SHARMA, 2010) e imonomodulatória (SIVEEN; KUTTAN, 2011), é um monoterpene frequentemente encontrado no óleo essencial de *A. absinthium* (TEGTMEIER; HARNISCHFEGGER, 1994; SIVEEN; KUTTAN, 2011).

O sabor amargo, bastante característico da infusão de *A. absinthium*, é causado pela presença de lactonas sesquiterpênicas, como por exemplo a absintina, anabsina e anabsintina (ABERHAM *et al*, 2010).

No entanto, compostos do óleo essencial geralmente apresentam baixa solubilidade em água. Como verificado por Lima *et al.* (2004) apenas 3% do óleo essencial presente na parte aérea de *Salvia officinalis* foi extraída por extração aquosa (chá), em relação à extração por hidrodestilação. Além disso, dos 60 compostos isolados por hidrodestilação, somente 25 foram identificados na infusão da erva, dos quais 86% pertencem à classe dos monoterpenos contendo oxigênio. A baixa solubilidade em água dos sesquiterpenos e diterpenos foi evidenciada pela baixa quantidade destes compostos na infusão (5%).

#### 5.1.2 Polissacarídeo da infusão – Obtenção, fracionamento e caracterização

Os polissacarídeos presentes na infusão da parte aérea de *A. absinthium*, foram isolados por precipitação etanólica. Foi observado um rendimento de 5,8% em relação à massa seca da erva utilizada na preparação da infusão. Para obtenção de quantidade suficiente de material para purificação foram realizadas diversas infusões a partir da parte aérea da planta e os polissacarídeos obtidos em cada uma delas foram reunidos em uma fração única denominada API (A - *absinthium*, PI – polissacarídeo da infusão).

A fração bruta API apresentou um baixo teor de carboidratos totais (17,8%) e somente 2,3% de proteínas. A composição monossacarídica desta fração mostrou a presença de Rha, Ara, Xyl, Man, Gal, Glc e ácido urônico na proporção de 1,5: 4,3: 1,4: 3,7: 8,5: 8,1: 1. Glucose e galactose foram os monossacarídeos majoritários na fração (tabela 1).

Inicialmente a amostra API apresentou um perfil de eluição polimodal por HPSEC, indicando a presença de vários componentes, os quais são provavelmente de baixa massa molar, pois não foi detectado sinal pelo MALLS, além do alto tempo de eluição (figura 10).

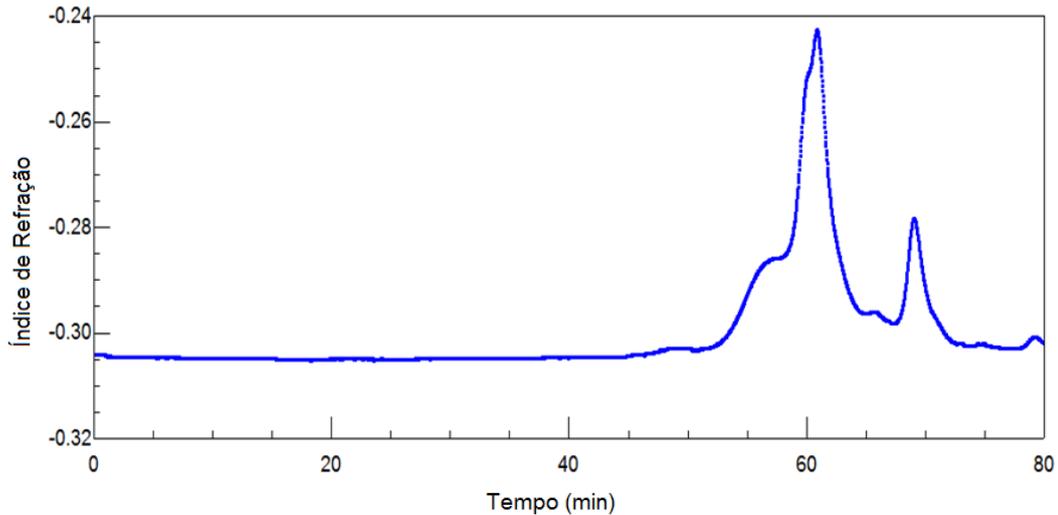


FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DO POLISSACARÍDEO BRUTO OBTIDO A PARTIR DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium* (API).  
 FONTE: O autor (2012)

A fração bruta API foi submetida a diversos processos de purificação, os quais estão esquematizados na figura 11. A composição monossacarídica das frações obtidas está indicada na tabela 1.

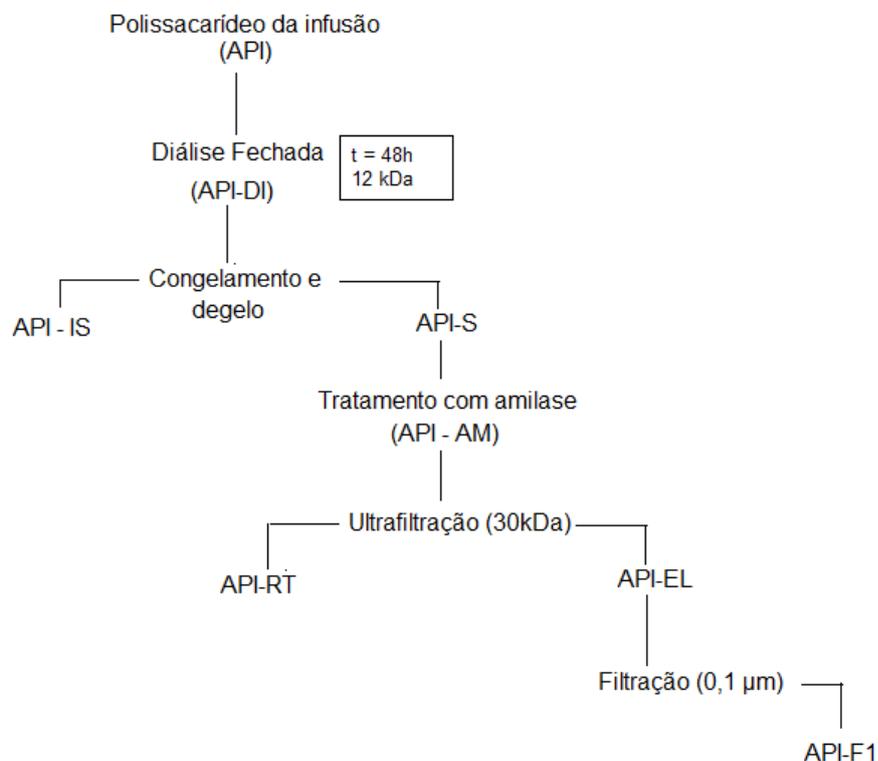


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium*  
 FONTE: O autor (2012)

Devido a presença de polímeros de baixa massa molar na fração bruta, os quais foram evidenciados pelo perfil de eluição por HPSEC, a amostra foi submetida à diálise fechada em membrana de 12.000 Da. Após a diálise, a fração retida na membrana (API-DI) foi submetida a fracionamento por congelamento-degelo, a qual originou um precipitado insolúvel em água fria (API-IS) rico em glucose, provavelmente devido à presença de amido nesta fração.

A amostra solúvel em água fria (API-S) era constituída majoritariamente por arabinose e galactose. No entanto, a fração ainda apresentava alta proporção de glucose (11%) e por isso foi submetida a tratamento enzimático para remoção de amido. Entretanto, o tratamento não reduziu a proporção de glucose na fração, sugerindo que a glucose não era constituinte do amido.

Após tratamento enzimático, a fração API-AM foi ainda submetida ao processo de ultrafiltração em membrana, com limite de exclusão de 30 kDa, sendo que a fração eluída (API-EL) foi posteriormente filtrada em membrana de 0,1 µm, resultando na fração denominada de API-F1.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium*

Fração	MONOSSACARÍDEOS (%) <sup>1</sup>							AU <sup>2</sup>
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
API	5,4	tr	15,0	4,9	12,9	29,9	28,3	3,5
API-DI	7,4	tr	13,1	4,1	11,7	33,4	24,2	6,0
API-IS	3,8	tr	25,1	16,4	11,0	16,0	27,7	nd
API-S	7,5	1,1	32,8	8,9	7,5	22,2	11,0	9,0
API-AM	6,3	tr	23,5	6,4	6,8	30,7	10,9	15,4
API-EL	11,2	tr	14,8	3,9	6,6	34,2	21,1	8,1
API-RET	10,2	2,2	16,6	1,7	6,0	33,6	21,4	8,0
API-F1	11,1	tr	16,3	4,0	7,6	37,3	15,2	8,5

1: acetato de alditol, determinado por GLC (ADAMS, 1965);

2: ácidos urônicos: determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973);

nd: não determinado;

tr: traços.

FONTE: O autor (2012)

Observa-se que no decorrer dos processos de purificação houve um aumento na quantidade de galactose e arabinose nas frações, sendo estes monossacarídeos majoritários na amostra API-F1. Foi verificado que as frações resultantes dos processos de purificação apresentavam uma maior massa molar em relação a amostra bruta API, observado pela diminuição do tempo de eluição destas frações por HPSEC (figura 12) e também pela detecção de sinal pelo espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) a partir da fração API-EL (dado não mostrado).

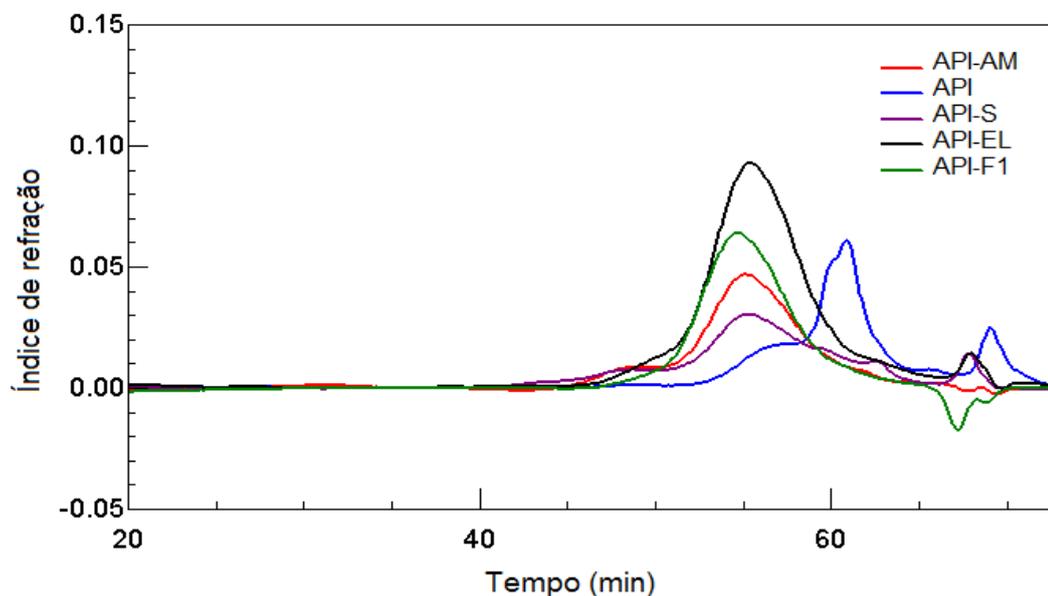


FIGURA 12 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PURIFICAÇÕES DO POLISSACARÍDEO BRUTO OBTIDO DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium*.

NOTA: Gráfico utilizando somente o detector de índice de refração.

FONTE: O autor (2012)

A fração API-F1 apresentou um perfil de eluição unimodal por HPSEC-MALLS, indicando a presença de uma amostra pura, portanto, esta fração foi escolhida para caracterização estrutural.

### 5.1.3 Caracterização da fração API-F1

O perfil de eluição da fração API-F1 por HPSEC, conforme apresentado na figura 13, apresentou somente um pico detectado simultaneamente pelos detectores de índice de refração, espalhamento de luz e ultravioleta (280 nm).

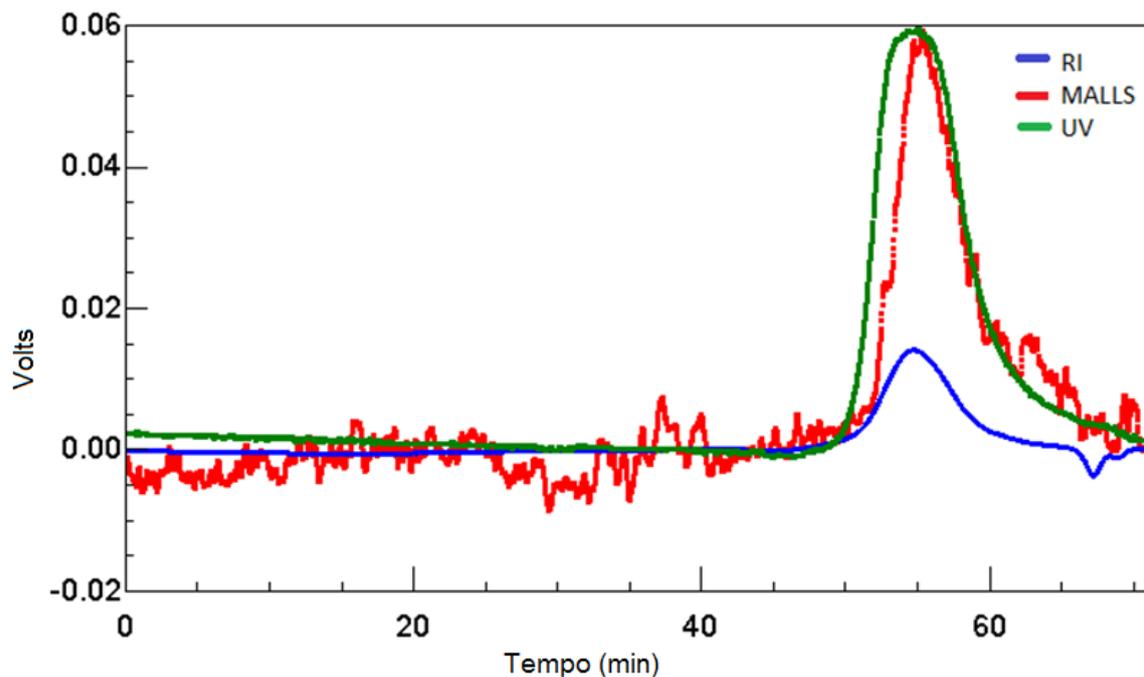


FIGURA 13 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DA FRAÇÃO API-F1, OBTIDA PELOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA BRUTA (API) EXTRAÍDA POR INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium*.

NOTA: RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo, 90° indicado em vermelho; UV – detector de ultravioleta, utilizado no comprimento de onda de 280 nm, indicado em verde.

FONTE: O autor (2012)

Esta fração contém 23% de carboidratos e 7% de proteínas. A composição monossacarídica apresentou como componente majoritário a galactose (37,3%) seguido de arabinose (16,3%), além de outros monossacarídeos neutros, como ramnose, xilose e glucose e também ácidos urônicos. A alta proporção de galactose e arabinose sugere a presença de uma arabinogalactana nesta fração.

As arabinogalactanas encontradas em plantas podem ser isoladas como polissacarídeos livres (WU *et al.*, 2005) ou em associação covalente com proteínas (HILLESTAD; WOLD; ENGEN, 1977). Neste caso, a presença de 7% de proteína na

fração pura (API-F1), sugere uma associação covalente da proteína com o polissacarídeo. Além disso, por HPSEC-MALLS/RI/UV foi possível observar a coeluição do sinal do detector de ultravioleta, o qual detecta a presença de proteínas, juntamente com o sinal dos outros dois detectores, fato que corrobora a hipótese que o polissacarídeo esteja ligado à proteína.

O rendimento desta fração, composta provavelmente por arabinogalactanas do tipo II, foi de 6% em relação ao material bruto inicial e a proporção de Gal:Ara foi de 2,3:1. Este valor é semelhante ao encontrado para uma arabinogalactana-proteína obtida dos estigmas e estiletos (tecidos reprodutivos femininos) de *Nicotiana glauca*, que apresentou uma proporção de 2,1:1 (GANE *et al.*, 1995). Das sementes do pinhão-manso (*Jatropha curcas*) também foram isoladas AGPs, com um rendimento de 0,98% em relação ao material total do endosperma, apresentando uma proporção menor de Gal:Ara de 1,2:1 (ZIPPEL; WELLS; HENSEL, 2010). Uma proporção muito maior de Gal:Ara foi encontrada para arabinogalactanas-proteínas isoladas do mel *kanuka* (Nova Zelândia), sendo de 5,3:1 (STEINHORN *et al.*, 2011).

A fração API-F1 também foi analisada por espectrometria de infravermelho (figura 14). Kačuráková *et al.* (2000) demonstraram que cada polissacarídeo particular apresenta por FT-IR uma banda específica na região de 1200 – 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

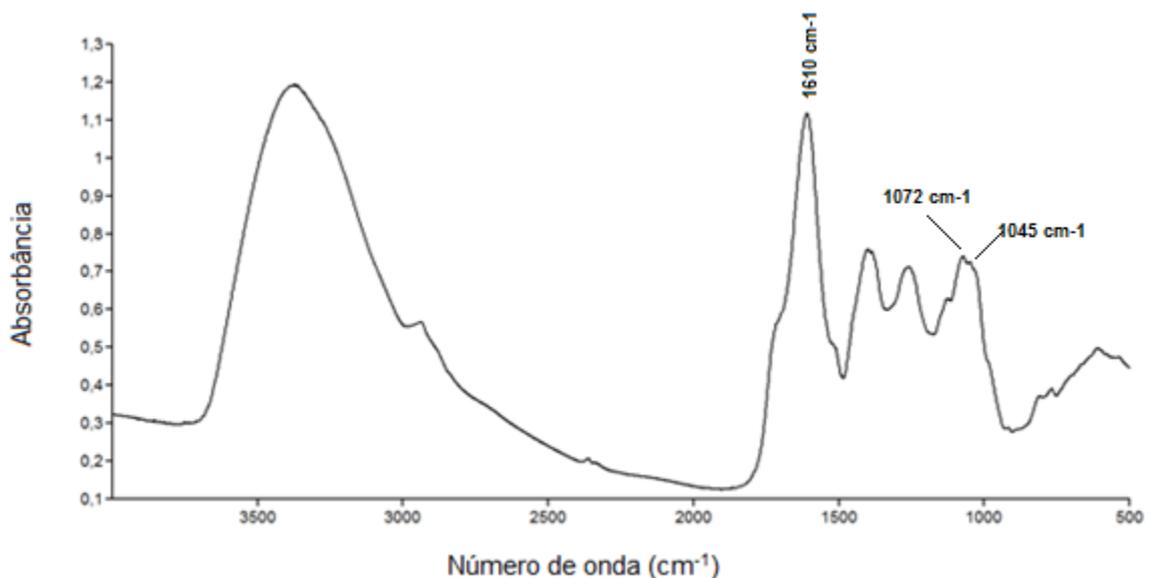


FIGURA 14 – ESPECTRO DE FT-IR DA FRAÇÃO API-F1.  
 FONTE: O autor (2012)

As  $\beta$ -arabinogalactanas apresentam duas bandas principais em 1074 e 1045  $\text{cm}^{-1}$  referentes a galactopirranose da cadeia principal e da arabinofuranose das ramificações, respectivamente. No espectro de FT-IR da fração API-F1 foi identificado em 1072  $\text{cm}^{-1}$  a banda característica da galactopirranose da cadeia e em 1045  $\text{cm}^{-1}$  uma banda discreta, atribuída à presença da arabinofuranose. A intensidade da absorvância varia com a quantidade relativa destes dois monossacarídeos na amostra (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000). A fração API-F1 apresentou uma banda intensa em 1610  $\text{cm}^{-1}$ , a qual foi atribuída à presença de proteína, provavelmente associada ao polissacarídeo. A região em torno de 1650  $\text{cm}^{-1}$  é característica da presença de proteínas. Esta banda é atribuída principalmente ao estiramento C=O da ligação peptídica. No entanto, quando a fração contém ácidos urônicos, como na amostra API-F1, o grupo carboxílico interfere, deslocando esta banda de proteína em direção a 1600  $\text{cm}^{-1}$  (BOULET; WILLIAMS; DOCO, 2007). A região em torno de 1650  $\text{cm}^{-1}$  também pode ser atribuída à absorvância dos grupos carboxílicos livres ( $\text{COO}^-$ ) pertencentes aos ácidos urônicos (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 1999). No espectro de FT-IR da fração API-F1 a absorvância dos grupos carboxílicos pode estar sobreposta com a absorvância da ligação peptídica, já que esta amostra contém 8,5% de ácidos urônicos e 7% de proteínas na sua composição.

A fração API-F1 apresentou por RMN-  $^{13}\text{C}$  sinais característicos de uma arabinogalactana do tipo II (figura 15). Em  $\delta$  103,4 foi encontrado o sinal referente ao carbono anomérico das unidades de  $\beta$ -D-Galp. Observa-se que este sinal é bastante alargado, provavelmente devido à sobreposição dos sinais das unidades de  $\beta$ -D-Galp ligadas (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) e (1 $\rightarrow$ 3,6), as quais apresentam deslocamentos muito semelhantes por RMN-  $^{13}\text{C}$ . A presença de  $\alpha$ -L-Araf no polímero foi confirmada pelos sinais em  $\delta$  109,1, 107,9 e 107,0, os quais foram atribuídos à arabinose presente como terminais não-redutores e das cadeias laterais (KARÁCSONYI; PATOPRSTÝ; KUBAČKOVÁ, 1998; CIPRIANI, 2007; STEINHORN *et al.*, 2011; REDGWELL *et al.*, 2011).

As arabinogalactanas do tipo II são formadas por cadeias curtas de (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -D-galactanas unidas umas às outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6. No espectro de RMN desta fração foi observado em  $\delta$  81,3 o sinal do carbono 3 ligado das unidades de  $\beta$ -D-Galp (REDGWELL *et al.*, 2011) e em 68,5 ppm o

carbono 6 ligado destas unidades (THUDE; CLASSEN, 2005; REDGWELL *et al.*, 2011).

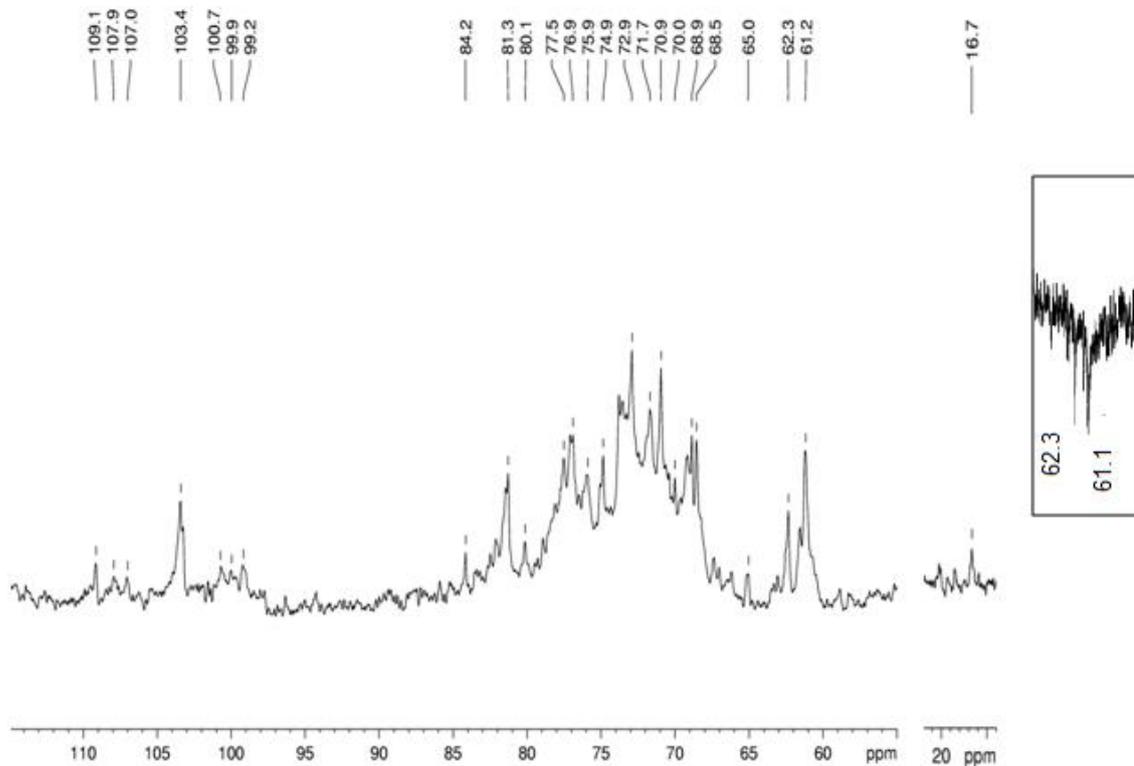


FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO API-F1 PURIFICADA DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium*. EXPERIMENTO REALIZADO EM D<sub>2</sub>O, A 50 °C

NOTA: DEPT de API-F1 no inserto.

FONTE: O autor (2012)

Foram observados também outros sinais na região do carbono anomérico ( $\delta$  92,1-107,5). O sinal em 100,7 ppm foi atribuído às unidades de  $\alpha$ -L-Rhap e o sinal referente às unidades de  $\beta$ -D-ácido glucurônico provavelmente está sobreposto ao sinal do carbono anomérico das unidades de  $\beta$ -D-Galp em  $\delta$  103,4 (KARÁCSONYI; PATOPRSTÝ; KUBAČKOVÁ, 1998; STEINHORN *et al.*, 2011). Embora a fração API-F1 contenha 8,5% de ácido urônico, não foi encontrado sinal correspondente aos grupos carboxílicos. O sinal de CH<sub>3</sub> das unidades de rarnose foi encontrado em campo alto, em 16,7 ppm.

Os carbonos do tipo -CH<sub>2</sub> foram assinalados com base no espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT, onde os sinais de tais carbonos aparecem invertidos (Figura 15 – inserto). O espectro da fração API-F1 apresentou dois sinais invertidos, em  $\delta$  62,2 e 61,0, os quais podem ser atribuídos ao C-5 e C-6 não substituídos das unidades de

$\alpha$ -L-Araf terminal e  $\beta$ -D-Galp da cadeia, respectivamente (NAVARINI *et al.*, 1999; SIMAS-TOSIN, 2008; REDGWELL *et al.*, 2011).

Para confirmar o tipo de arabinogalactana presente na fração API-F1 é necessário realizar a metilação da amostra, a qual informa a posição das ligações glicosídicas (CARPITA; McCANN, 2000).

A metilação de polissacarídeos contendo ácidos urônicos pode levar a  $\beta$ -eliminação em meio fortemente alcalino e subsequente degradação por hidrólise ácida (HILLESTAD; WOLD; ENGEN, 1977). Mas o principal problema associado aos ácidos urônicos é sua resistência à hidrólise, devido a formação de ácidos aldobiurônicos (ácido urônico ligado através de seu C-1 a um açúcar redutor neutro) o que acarreta na perda da detecção do ácido urônico e do açúcar ligado a ele (THUDE; CLASSEN, 2005). Por isso, devido a presença de ácidos urônicos na fração API-F1, foi realizado inicialmente a carboxi-redução da amostra, convertendo o ácido urônico em seu respectivo açúcar neutro. Assim, também foi possível determinar o tipo de ácido urônico presente, pelo aumento na proporção de galactose ou glucose na amostra carboxi-reduzida (API-CX), em relação à composição original da fração API-F1.

A carboxi-redução de API-F1 indicou que o ácido urônico presente nesta fração corresponde ao ácido glucurônico, devido ao aumento da quantidade de glucose proporcional à diminuição do ácido urônico após a carboxi-redução (tabela 2).

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PURIFICADA API-F1 E DA FRAÇÃO APÓS CARBOXI-REDUÇÃO (API-CX)

	MONOSSACARÍDEOS (%) <sup>1</sup>							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU <sup>2</sup>
API-F1 <sup>3</sup>	11,1	tr	16,3	4	7,6	37,3	15,2	8,5
API-CX <sup>4</sup>	10,4	3,1	11,8	3,5	10,7	38,8	21,8	0,9

<sup>1</sup> acetato de alditol (ADAMS, 1965);

<sup>2</sup> ácidos urônicos, determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973);

<sup>3</sup> composição determinada por GLC;

<sup>4</sup> composição determinada por GLC-MS.

FONTE: O autor (2012)

A análise de metilação (tabela 3) confirmou a presença de uma arabinogalactana do tipo II na fração API-F1, devido a presença dos derivados

metilados 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Gal e 2,4-Me<sub>2</sub>-Gal como principais constituintes da amostra, os quais correspondem respectivamente a galactose ligada (1→3) da cadeia principal e a galactose ligada (1→3,6) dos pontos de ramificação. A proporção entre estes dois derivados na amostra foi de 1:1, valor inferior ao encontrado por Redgwell *et al.* (2011) em uma AGP de *Lycium barbarum* que foi de 1:2,6. Em uma fração contendo AGPs isolada do vinho tinto esta proporção foi ainda maior, 1:3,7, indicando tratar-se de uma arabinogalactana altamente ramificada. (PELLERIN; WATERS; BRILLOUET, 1993).

TABELA 3 - ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO API-F1.

Derivado metilado	Ligações
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	terminal
2,4-Me <sub>2</sub> -Rha	→)3
3-Me-Rha	→)2,4
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	terminal
3,5-Me <sub>2</sub> -Ara	→)2
2-Me-Ara	→)3,5
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	→)5
2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	→)3,4
2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	→)3,6
2-Me-Gal	→)3,4,6
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	→)3
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	→)6
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	terminal
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	terminal
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	→)4
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	terminal

FONTE: O autor (2012)

A presença do derivado metilado 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Gal indica que, cadeias laterais de galactanas (1→6) também compõem a estrutura da AGP presente na fração API-F1. Pellerin, Waters e Brillouet (1993) sugerem que estas cadeias laterais também podem estar substituídas em O-3 e O-4 por unidades de arabinose, o que explica a presença do derivado metilado 2-Me-Gal, correspondente à galactose ligada (1→3,4,6). Este derivado metilado também foi encontrado por Steinhorn *et al.* (2011) em uma AGP isolada do mel.

Também foi identificada a presença do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Ara indicando que as cadeias de galactana são provavelmente ramificadas por arabinose unidas por ligações (1→5). A natureza complexa destas cadeias laterais fica evidente pela presença dos metilados 3,5-Me<sub>2</sub>-Ara e 2-Me-Ara, os quais correspondem à arabinose em ligação (1→2) e (1→3,5), respectivamente. Estes mesmos derivados metilados também foram encontrados na análise de metilação de uma AGP isolada de *Lycium barbarum* (REDGWELL *et al.*, 2011). Uma AGP isolada por precipitação com o reagente de Yariv do pólen de *A. vulgaris* apresenta cadeias laterais ramificadas de arabinanas, conforme apresentado na figura 16. As arabinoses apresentam-se substituídas em 5-, 2,5-, 3,5- e 2,3,5- (LEONARD *et al.*, 2005). Esta característica difere das típicas arabinogalactanas do tipo II encontradas em plantas. No entanto, mesmo apresentando características diferentes, esta AGP foi isolada por precipitação com o reagente de Yariv, específico para esta classe de moléculas.

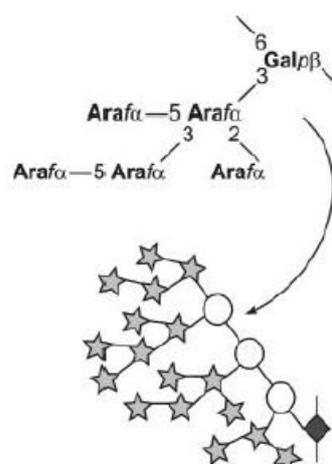


FIGURA 16 – MODELO ESTRUTURAL PROPOSTO PARA AS CADEIAS LATERAIS DE ARABINANAS DA AGP DO PÓLEN DE *A. vulgaris*.

NOTA: Os círculos em branco representam unidades de galactopiranosose, as estrelas em cinza a arabinofuranose e o losango preto o aminoácido hidroxiprolina.

FONTE: LEONARD *et al.* (2005).

As cadeias laterais das arabinogalactanas-proteínas podem ser constituídas por várias combinações de unidades de galactose e arabinose, sendo que predominantemente estas cadeias laterais terminam em unidades de arabinose. No entanto, outros açúcares também podem ser encontrados como unidades terminais, como por exemplo, a ramnose e o ácido glucurônico (REDGWELL *et al.*, 2011). Na fração API-F1 foram encontrados como unidades terminais a arabinose, a ramnose, a glucose e também a manose. Como a metilação foi realizada na fração carboxi-reduzida, parte das unidades encontradas como glucose são oriundas do ácido glucurônico. Este monossacarídeo ácido também foi encontrado como terminal não-redutor das cadeias laterais de galactose (1→6) e (1→3,6) da AGP isolada das raízes de *Echinacea pallida* (THUDE; CLASSEN, 2005). Segundo Redgwell *et al.* (2011) o ácido glucurônico está sempre unido por ligação (1→6) às unidades de galactose da cadeia e as unidades terminais de ramnose são ligadas ao ácido glucurônico através de ligação (1→4), como mostra a figura 17. A presença do ácido glucurônico substituído em O-4 foi confirmada na amostra API-F1, devido a presença do derivado metilado 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc.

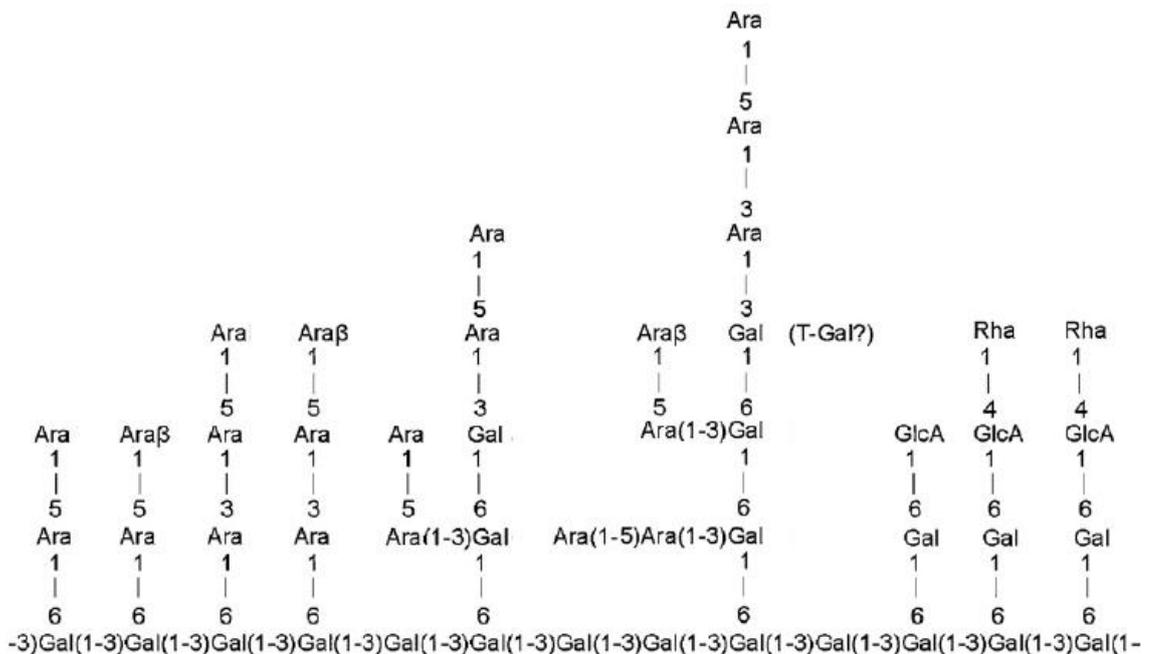


FIGURA 17 – MODELO HIPOTÉTICO REPRESENTANDO AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA PORÇÃO POLISSACARÍDICA DAS AGPs.  
 FONTE: Adaptado de REDGWELL *et al.* (2011)

Na fração API-F1, a ramnose foi encontrada ligada 3-, 2,4- e como terminal não-redutor. A presença de ramnose foi encontrada na maioria das AGPs dos artigos revisados (THUDE; CLASSEN, 2005; WANG *et al.*, 2005; REDWELL *et al.*, 2011), indicando que a ramnose é uma característica estrutural das AGPs e não está somente associada com a contaminação por polissacarídeos pécnicos. Contradizendo a afirmação de que as AGPs não ocorrem associadas a pectinas, Karácsonyi, Patoprstý e Kubačková (1998) sugerem que a AGP possa estar interligada através do O-4 da ramnose a um fragmento de ramnogalacturonana, formando um complexo pectina-arabinogalactana-proteína.

A fração API-F1 foi submetida a oxidação com periodato resultando na fração API-OPE. A oxidação com periodato resultou na perda de mais de 50% do material inicial, devido a presença de unidades susceptíveis ao periodato. O aumento da quantidade de galactose na amostra oxidada (Tabela 4) indica que estas unidades são resistentes à oxidação, o que confirma que grande parte das unidades de galactose presentes na amostra são unidas por ligação (1→3), característica da cadeia principal de arabinogalactanas do tipo II.

A quantidade dos demais monossacarídeos foi também alterada, destacando a arabinose que foi diminuída à praticamente metade de sua quantidade original. Isso se deve à presença de unidades susceptíveis à oxidação pelo periodato, como arabinose ligada (1→5), devido a existência das hidroxilas vicinais nos C-2 e C-3. A permanência de monossacarídeos susceptíveis à oxidação com periodato na fração API-OPE pode ser devido à oxidação incompleta do material, já que o processo só foi realizado uma vez.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PURIFICADA API-F1 E DA FRAÇÃO OXIDADA COM PERIODATO (API-OPE)

	MONOSSACARÍDEOS (%) <sup>1</sup>							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU <sup>2</sup>
API-F1	11,1	tr	16,3	4	7,6	37,3	15,2	8,5
API-OPE	13,1	tr	8,8	2,9	9,2	49,2	11,3	5,5

<sup>1</sup> acetato de alditol, analisado por GLC (ADAMS, 1965);

<sup>2</sup> ácidos urônicos, determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973);

FONTE: O autor (2012)

A massa molar média desta fração foi calculada por espalhamento de luz, sendo o  $M_w$  84.160 g/mol ( $dn/dc$  0,159 ml/g). De acordo com Showalter (1993) a massa molar das AGPs varia amplamente entre as espécies de plantas, o que provavelmente é devido a diferentes graus de glicosilação destas moléculas. A massa molar encontrada para a fração API-F1 foi relativamente maior que a de uma arabinogalactana do tipo II isolada das folhas de *Maytenus ilicifolia* com  $M_w$  de 11.400 g/mol (CIPRIANI, 2007).

A fração apresentou uma rotação óptica específica de  $-186^\circ$ . Em uma revisão realizada por Clarke, Anderson e Stone (1979) arabinogalactanas do tipo II isoladas de diferentes plantas apresentaram ou um baixo valor positivo ou predominantemente um valor alto e negativo de rotação óptica específica. Isto reflete a preponderância da configuração  $\beta$ -D para as unidades de galactose e  $\alpha$ -L para a arabinose, constituintes da arabinogalactana.

## 5.2 *Artemisia vulgaris*

### 5.2.1 Obtenção e caracterização da infusão

A infusão da parte aérea de *A. vulgaris*, preparada nas condições descritas na literatura popular (LORENZI; MATOS, 2008), foi denominada de VI (vulgaris infusão). O material liofilizado obtido da infusão apresentou 20% de rendimento, semelhante ao rendimento descrito por Walch *et al.* (2011) para a infusão da parte aérea de *Salvia officinalis* que foi de 25%.

Considerando o rendimento obtido, é possível estimar que a cada xícara de chá (200 ml) da infusão da parte aérea de *A. vulgaris* são ingeridos cerca de 260 mg do material liofilizado ou uma dose equivalente a 1300  $\mu$ g/ml.

A infusão de *A. vulgaris* mostrou ser constituída por 40,0%  $\pm$  3,15 de açúcar, 2,9%  $\pm$  0,41 de proteínas e 9,8%  $\pm$  1,86 de compostos fenólicos. Comparando à infusão da outra espécie, o teor de fenólicos totais na infusão de *A. vulgaris* (VI) foi ~ 2,5 vezes maior do que aquela encontrada para a infusão de *A. absinthium* (AI). A quantidade de compostos fenólicos obtida para VI foi superior ao valor descrito na

literatura para o chá vermelho de *Camellia sinensis* (ALMAJANO *et al.*, 2008). De acordo com Almajano *et al.* (2008), a proporção de compostos fenólicos nos diferentes tipos de chá de *C. sinensis* varia de 5,5% no chá vermelho até 14,5% de fenólicos totais no chá branco. A amostra VI apresentou um elevado teor de carboidratos. No entanto, após ampla revisão bibliográfica, não foi encontrado nenhum relato sobre os polissacarídeos presentes na infusão da parte aérea desta espécie.

A infusão de *A. vulgaris* foi submetida a análise de homogeneidade por HPSEC (figura 18). Assim como a infusão de *A. absinthium*, a amostra VI também apresentou perfil de eluição polimodal, devido a presença de diversos componentes, os quais são predominantemente de baixa massa molar, pois apresentam um alto tempo de eluição.

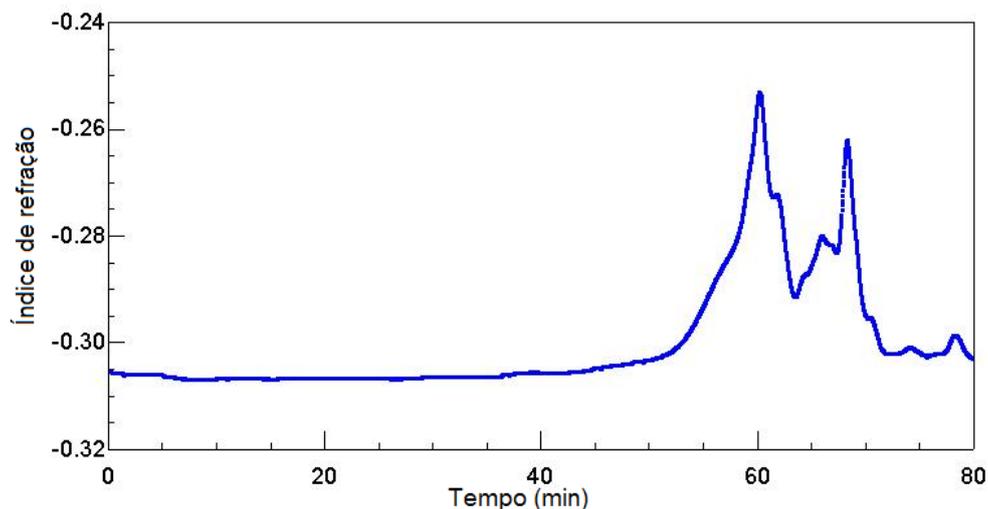


FIGURA 18 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* (VI).  
 FONTE: O autor (2012)

A figura 19 representa o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da amostra VI, proveniente da infusão da parte aérea de *A. vulgaris*. Diferentemente do espectro da infusão de *A. absinthium*, o espectro de VI mostrou-se bastante simples, com seis sinais predominantes, localizados da região dos carboidratos (115 a 60 ppm), provavelmente por esta amostra ser constituída por 40% de açúcar.

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C de VI é semelhante ao espectro da inulina isolada dos tubérculos da *Dahlia sp* (GRZYBOWSKI, 2008). A inulina é um carboidrato de

reserva, encontrado em plantas, constituído por unidades de frutose unidas por ligação  $\beta(2\rightarrow1)$ .

Os seis sinais de maior intensidade foram atribuídos à  $\beta$ -D-frutose, sendo encontrado em  $\delta$  103,2 o sinal correspondente ao C-2 ligado ( $2\rightarrow1$ ), em 81,1 (C-5), 77,3 (C-3), 74,6 (C-4), 62,2 (C-6) e em 61,0 ppm (C-1). Os sinais de menor intensidade localizados na região de 80-63 ppm são provavelmente referentes à unidades de  $\alpha$ -D-Glc, a qual apresenta-se ligada na extremidade inicial da cadeia da frutana por uma ligação do tipo ( $1\rightarrow2$ ) (EDELMAN; JEFFORD, 1968). O sinal do carbono anomérico da  $\alpha$ -D-Glc foi observado em  $\delta$  92,4 (FONTANA *et al.*, 1994; CHANDRASHEKAR; PRASHANTH; VENKATESH, 2011). Os resultados indicam que, provavelmente, a inulina seja o composto majoritário na infusão de *A. vulgaris*.

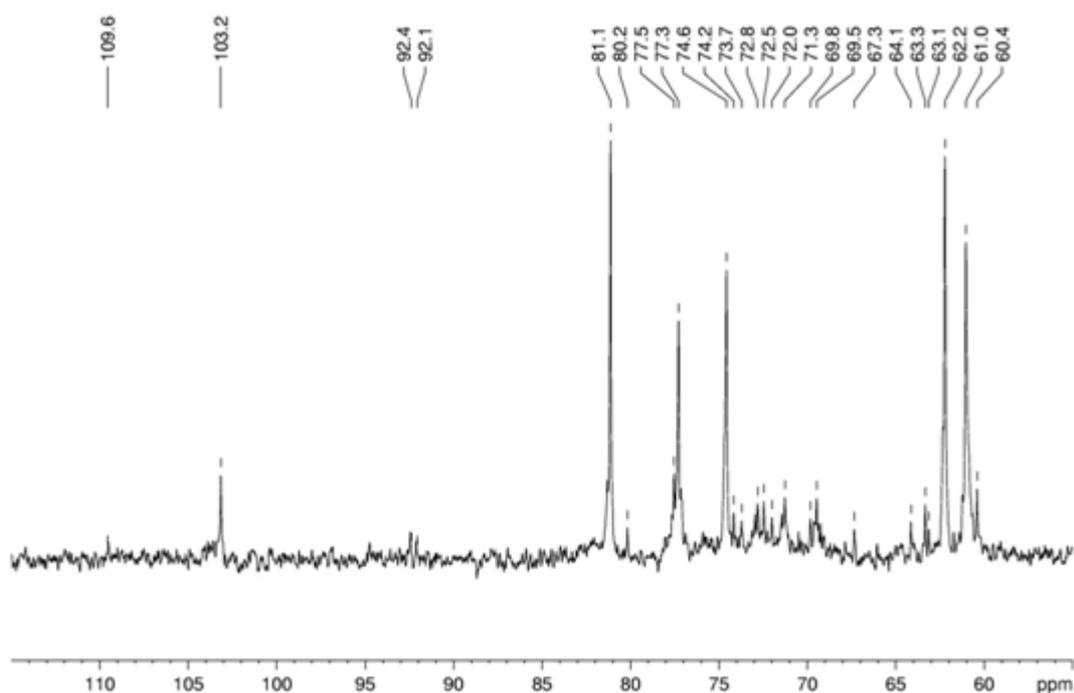


FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* (VI). EXPERIMENTO REALIZADO EM  $\text{D}_2\text{O}$ , A 50  $^\circ\text{C}$ . FONTE: O autor (2012)

Embora não tenha sido detectado pela análise de RMN sinais referentes à compostos fenólicos, a amostra VI apresentou 9,8% de fenólicos totais e além destes, outros componentes ativos já foram identificados em preparações de *A. vulgaris* como lactonas sesquiterpênicas, óleo essencial e traços de alcalóides

(JUDZENTIENE; BUZELYTE, 2006; GOVINDARAJ *et al.*, 2008). Os compostos do óleo essencial incluem cânfora, tujona, germacreno D, 1,8-cineol, sabineno,  $\beta$ -cariofileno (BLAGOJEVIC *et al.*, 2006; GOVINDARAJ *et al.*, 2008). De acordo com Walch *et al.* (2011) extratos aquosos como o chá, favorecem a extração de polifenóis, mas compostos do óleo essencial estão presentes em baixa quantidade neste tipo de extrato.

### 5.2.2 Polissacarídeo da infusão – Obtenção e caracterização

Os polissacarídeos presentes na infusão da parte aérea de *A. vulgaris*, preparada conforme descrito em seu uso popular, foram isolados por precipitação etanólica. Os polissacarídeos isolados nestas condições apresentaram um rendimento de 7,0% em relação à massa seca da erva utilizada na preparação da infusão. O polissacarídeo bruto obtido a partir das infusões da parte aérea da planta foi nomeado de VPI (V- *vulgaris*, PI – polissacarídeo da infusão) e apresentou um teor de carboidratos totais de 43,0% e 6,2% de proteína.

A composição monossacarídica da amostra VPI mostrou a presença de ramnose, arabinose, manose, galactose, glucose, ácido urônico e xilose na proporção de 1,7: 2,5: 5,2: 4,2: 14: 1,8: 1. O componente majoritário da fração foi a glucose (46,3%) seguida da manose (17,2%). O perfil de eluição de VPI por HPSEC está apresentado na figura 20.

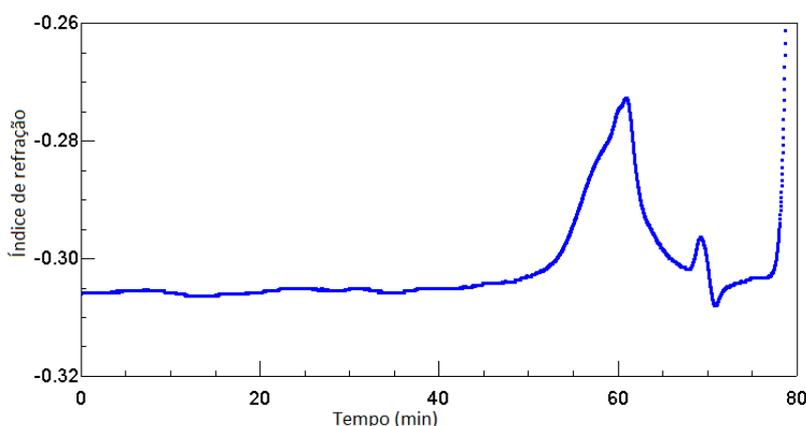


FIGURA 20 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO BRUTO OBTIDO A PARTIR DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* (VPI).  
FONTE: O autor (2012)

A análise de homogeneidade por HPSEC, demonstrou a presença de uma amostra heterogênea, cujos componentes possuem baixa massa molar, pois apresentam um alto tempo de eluição e não são detectados pelo espalhamento de luz.

Em contraste à composição monossacarídica, a amostra VPI apresentou um espectro de RMN-<sup>13</sup>C bastante definido (figura 21), com seis sinais predominantes, muito intensos. A análise de literatura, revelou que o espectro observado para a amostra é muito similar ao espectro de RMN-<sup>13</sup>C da inulina, um carboidrato de reserva, constituído por unidades de frutose unidas por ligação  $\beta(2\rightarrow1)$ , o qual já havia sido identificado na infusão desta espécie (VI).

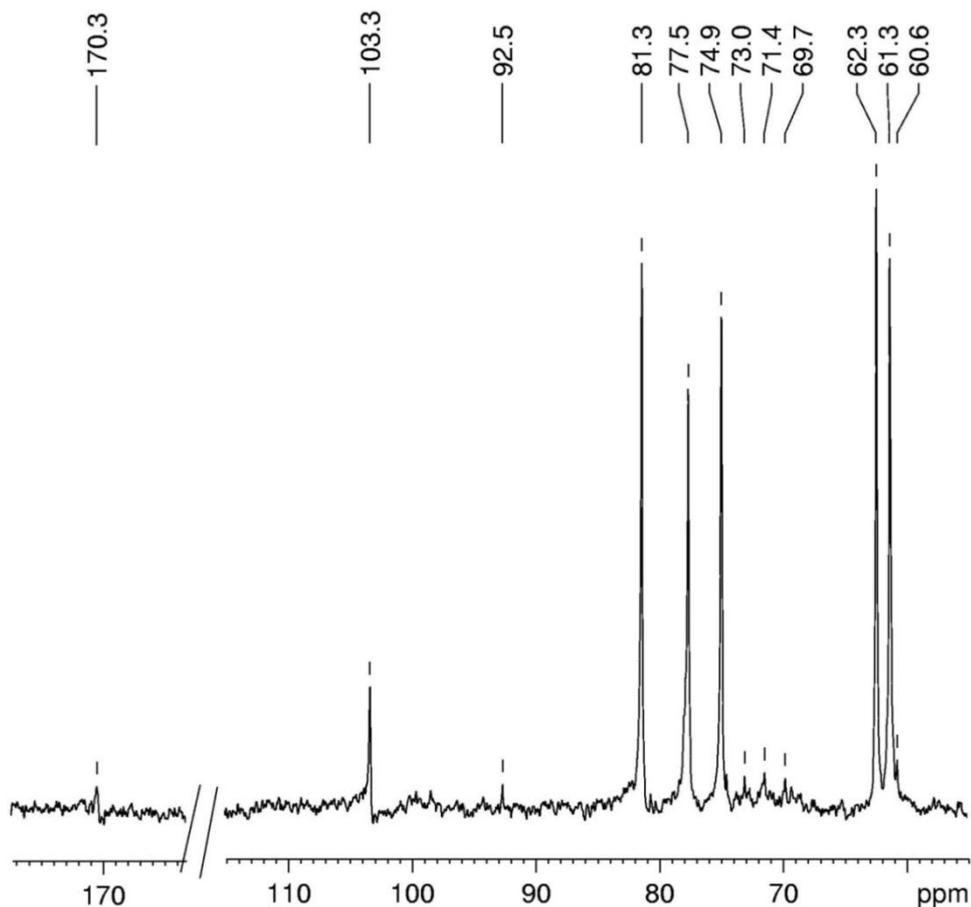


FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO VPI OBTIDA POR INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris*. EXPERIMENTO REALIZADO EM D<sub>2</sub>O, A 50 °C.  
FONTE: O autor (2012)

Os seis sinais de maior intensidade foram atribuídos à  $\beta$ -D-frutose, sendo encontrado em  $\delta$  103,3 o sinal correspondente ao C-2 ligado (2 $\rightarrow$ 1), em 81,3 (C-5),

77,5 (C-3), 74,9 (C-4), 62,3 (C-6) e em 61,3 ppm (C-1). Os sinais de menor intensidade foram atribuídos à presença de uma unidade de  $\alpha$ -D-Glc, a qual apresenta-se ligada na extremidade inicial da cadeia da frutana por uma ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 2) (EDELMAN; JEFFORD, 1968). Os deslocamentos químicos referentes à unidade de  $\alpha$ -D-Glc são  $\delta$  92,5 (C-1), 73,0 (C-3), 71,4 (C-2), 69,7 (C-4), 60,6 (C-6) (FONTANA *et al.*, 1994; CHANDRASHEKAR; PRASHANTH; VENKATESH, 2011). O espectro encontrado para a amostra VPI é extremamente semelhante ao espectro de RMN-  $^{13}\text{C}$  de um padrão de inulina isolado das raízes de chicória e analisado por Chandrashekar, Prashanth e Venkatesh (2011).

O protocolo de hidrólise utilizado para todas as amostras neste trabalho, consistia em utilizar TFA 2 mol/l, em banho fervente por 5 horas. No entanto, como as frutanas são extremamente lábeis em ácido (FONTANA *et al.*, 1994), a hidrólise foi realizada sob condições mais amenas, utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 mmol/l, em banho fervente, por somente 15 minutos (GRZYBOWSKI, 2008), a fim de não degradar os monossacarídeos resultantes do processo de hidrólise.

Para verificar a presença de frutose nesta amostra, após a hidrólise do material, foram realizados dois métodos cromatográficos: (a) Cromatografia em camada delgada e (b) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Na cromatografia em camada delgada, a amostra VPI hidrolisada foi analisada juntamente com um padrão de frutose e glucose, este último como controle negativo, uma vez que o reagente utilizado para revelação dos compostos era específico para cetoses. Neste ensaio foi possível visualizar a presença de frutose na amostra VPI, que apresentou uma banda com o mesmo  $R_f$  do padrão de frutose. Nesta cromatografia, também foram utilizadas as amostras VI, AI e API. Como esperado, além da amostra VPI, somente foi detectada a presença de frutose na infusão de *A. vulgaris* (VI), confirmando os dados da análise de RMN  $^{-13}\text{C}$ . O perfil cromatográfico obtido neste ensaio está apresentado na figura 22.

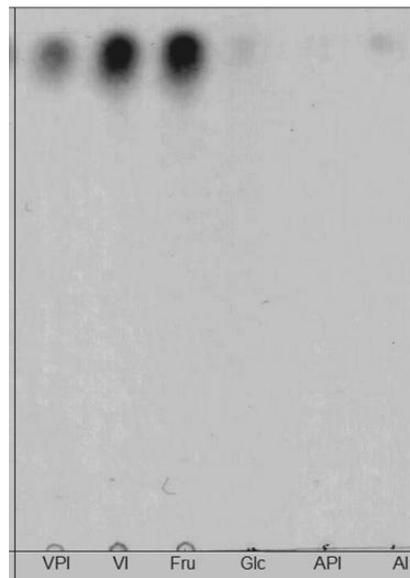


FIGURA 22 - PERFIL CROMATOGRÁFICO (TLC) DAS AMOSTRAS DE *A. vulgaris* E *A. absinthium* HIDROLISADAS COM  $H_2SO_4$  10 mmol/l (pH 2,0) POR 15 MINUTOS.

NOTA: VPI – Polissacarídeo da infusão de *A. vulgaris*, VI – Infusão de parte aérea de *A. vulgaris*, Fru – Padrão de frutose, Glc – Padrão de glicose, API – Polissacarídeo da infusão de *A. absinthium*, AI – Infusão da parte aérea de *A. absinthium*. Fase móvel: 1-butanol/2-propanol/ $H_2O$  (3:12:4) v/v/v. Revelador: Reagente uréia-ácido fosfórico.

FONTE: O autor (2012)

A fim de confirmar a presença de frutose nas amostras da infusão (VI) e do polissacarídeo da infusão de *A. vulgaris* (VPI), foi realizada também uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando um padrão de frutose (1mg/ml). Confirmando os dados apresentados anteriormente, as amostras VI e VPI hidrolisadas apresentaram por HPLC um pico principal, coeluinto com o padrão de frutose, conforme mostrado na figura 23.

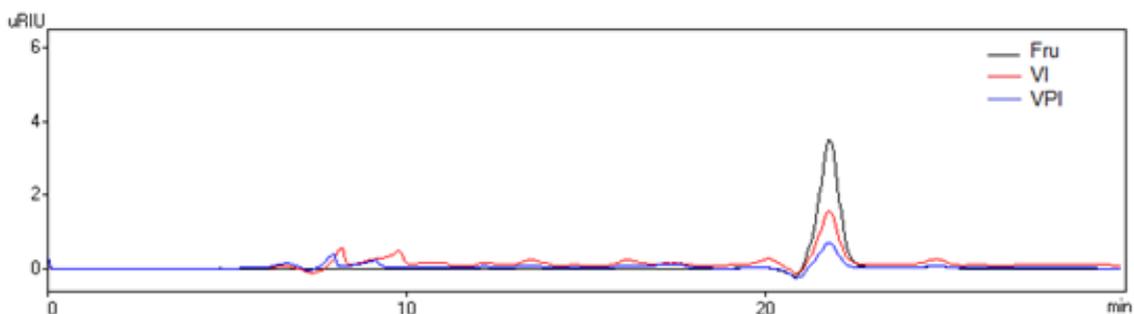


FIGURA 23 - SOBREPÓSICÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC DAS AMOSTRAS VI E VPI (HIDROLISADAS COM  $H_2SO_4$  10 mmol/l, pH 2,0, 15 MINUTOS) COM O PADRÃO DE FRUTOSE.

FONTE: O autor (2012)

A amostra VPI foi submetida a alguns processos de purificação (diálise em membrana de 12000 Da, fracionamento por congelamento e degelo, tratamento com  $\alpha$ -amilase, ultrafiltração em membrana de 30 kDa) a fim de identificar a presença de outros polissacarídeos além da frutana. No entanto, como observado no espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (figura 24) da fração eluída na membrana de 30 kDa (VPI-ELU) os sinais referentes à frutana são ainda predominantes e na região do carbono anomérico não foi encontrado nenhum outro sinal além do C-2 da  $\beta$ -D-Fru.

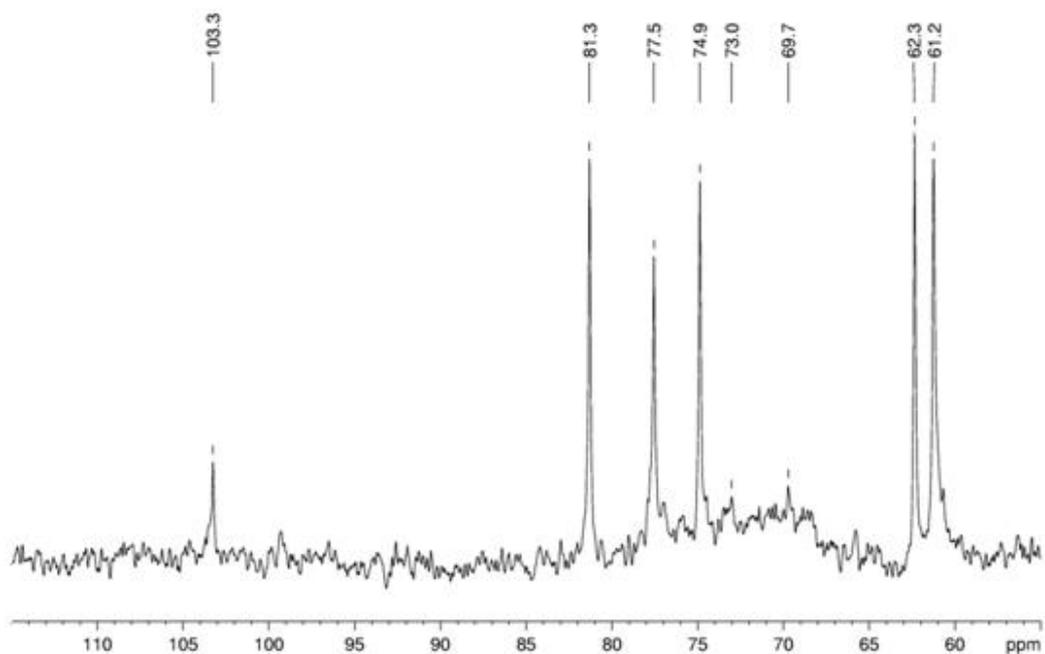


FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO VPI-ELU OBTIDA APÓS DIVERSOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA BRUTA VPI. EXPERIMENTO REALIZADO EM  $\text{D}_2\text{O}$ , A 50  $^\circ\text{C}$ .

FONTE: O autor (2012)

Dessa forma, para determinar a proporção das frutanas em relação a quantidade total de carboidrato nas amostras VI e VPI, foi utilizado o método da antrona modificado, o qual detecta a presença de frutose livre ou combinada em solução. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

A proporção de frutose encontrada na amostra VPI foi bastante alta. Considerando que 43% da fração consiste de carboidratos e 36,6% destes açúcares são cetoses, então 85% desta amostra é constituída por frutanas. Para a amostra VI 65% dos carboidratos são frutanas. No alho comum (*Allium sativum*)

aproximadamente 65% da massa seca consiste de frutanas, o que equivale a 84% do conteúdo de carboidratos presentes nesta espécie (LAWSON; WANG<sup>4</sup>, 1995 citado por CHANDRASHEKAR; PRASHANTH; VENKATESH, 2011).

TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NAS AMOSTRAS VI e VPI.

Amostra	Cetose (%) <sup>1</sup>	Açúcar total (%) <sup>2</sup>	Concentração de frutose (%) <sup>3</sup>
VI	25,8	40	65
VPI	36,6	43	85

<sup>1</sup> Determinado por método colorimétrico da antrona modificado (POLLOCK, 1982);

<sup>2</sup> Determinado por método colorimétrico (DUBOIS *et al.*, 1956);

<sup>3</sup> Concentração de frutose em relação a proporção de açúcar total na amostra.

FONTE: O autor (2012)

As frutanas são encontradas em quase todas as espécies da família Asteraceae (CHOQUE DELGADO; TAMASHIRO; PASTORE, 2010) e são geralmente armazenadas em órgãos especializados, como nos tubérculos da dália (*Dahlia sp.*) e nas raízes tuberosas da chicória (*Chicorium intybus*) (RITSEMA; SMEEKENS, 2003).

No entanto, a presença de frutanas já foi detectada nas folhas de *Rhododendron ferrugineum*, da família Ericaceae, a qual é utilizada na medicina popular no tratamento de diversas doenças, como por exemplo reumatismo (LOUIS *et al.*, 2010).

A presença de frutanas já foi descrita para a espécie *A. vulgaris*, mas como um constituinte das raízes (USDA-ARS-NGRL, 2004). Nenhum trabalho encontrado na literatura até o momento descreve a presença de frutanas na parte aérea destas plantas.

<sup>4</sup> LAWSON, L.D.; WANG, Z.Y.J. Changes in the organosulfur compounds released from garlic during aging in water, dilute ethanol, or dilute acetic acid. *J. Toxicol*, v. 14, p. 214, 1995.

### 5.3 EFEITOS DAS INFUSÕES E DOS POLISSACARÍDEOS DE *A. absinthium* E *A. vulgaris* SOBRE AS CÉLULAS THP-1

#### 5.3.1 Estratégia experimental para os ensaios de atividade biológica

Como os ensaios biológicos foram realizados sobre as células THP-1 diferenciadas (macrófagos) e não-diferenciadas (monócitos), para melhor compreensão, o fluxograma a seguir mostra quais ensaios foram realizados sobre cada tipo de célula e também as concentrações das infusões e dos polissacarídeos utilizadas.

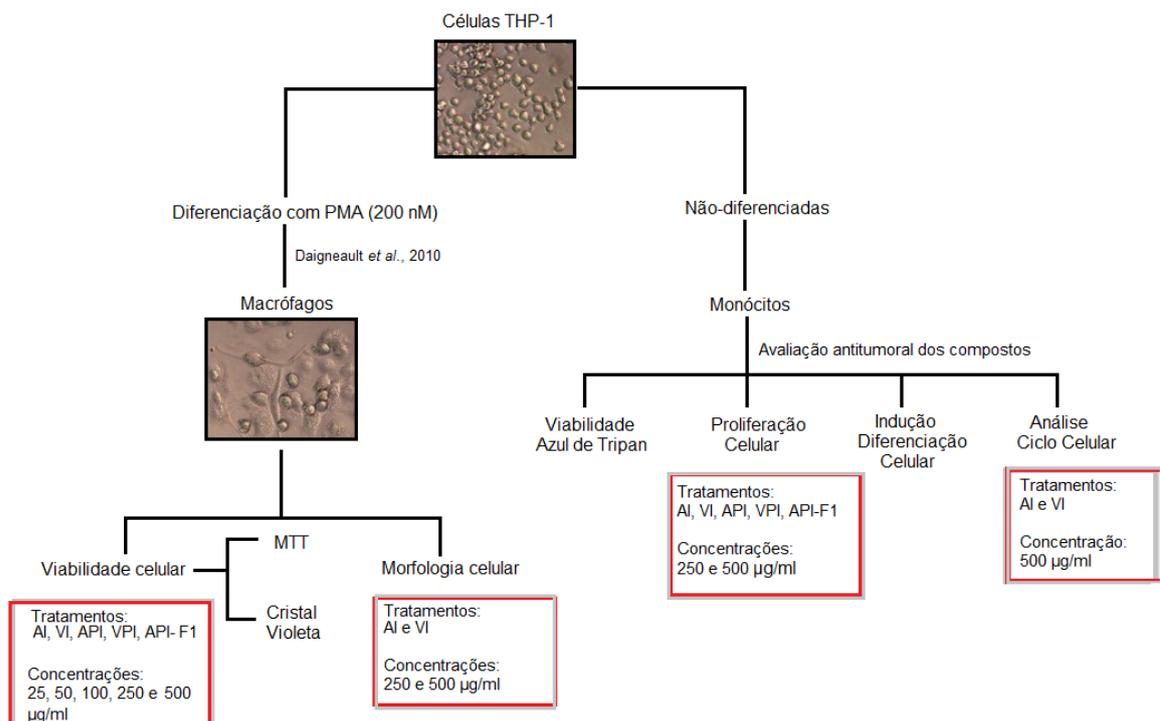


FIGURA 25 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS COM AS CÉLULAS THP-1.

NOTA: Os quadrados vermelhos indicam quais amostras foram utilizadas em cada ensaio e a concentração.

FONTE: O autor (2012).

### 5.3.2 Células THP-1 diferenciadas (macrófagos)

#### 5.3.2.1 Efeitos sobre a viabilidade celular

Inicialmente as infusões (AI e VI), os polissacarídeos das infusões (API e VPI) e a fração polissacarídica purificada (API-F1) foram avaliados quanto a citotoxicidade em relação às células THP-1 diferenciadas (THP-1d), a fim de definir as concentrações a serem utilizadas nos demais experimentos. Para isso, as células foram expostas aos tratamentos nas concentrações de 25 a 500 µg/ml por 48 horas e em seguida a viabilidade das células foi avaliada pelos métodos do MTT e cristal violeta. A figura 26 representa o efeito dos tratamentos sobre a viabilidade das células THP-1d utilizando o método do cristal violeta. É possível notar que somente a amostra API-F1 na maior concentração diminuiu em 7% a viabilidade das células. Todas as demais amostras avaliadas, não afetaram a viabilidade celular.

Pelo método do MTT, cujos resultados estão apresentados na figura 27, nenhum composto diminuiu a viabilidade das células, em nenhuma das concentrações testadas. Pelo contrário, algumas amostras como a infusão de *A. absinthium* (AI) aumentou a atividade metabólica das células, verificado no gráfico como um aumento na viabilidade celular em relação ao controle. Isto porque o método do MTT é um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade das células através de sua atividade metabólica. Portanto, um aumento na viabilidade celular também pode ser interpretado como estimulação do metabolismo induzida pelos tratamentos.

Dessa forma, como as amostras não afetam a viabilidade celular, foram escolhidas para os demais experimentos as concentrações: 250 e 500 µg/ml, tanto para os ensaios com as células THP-1d, quanto para as não-diferenciadas (monócitos).

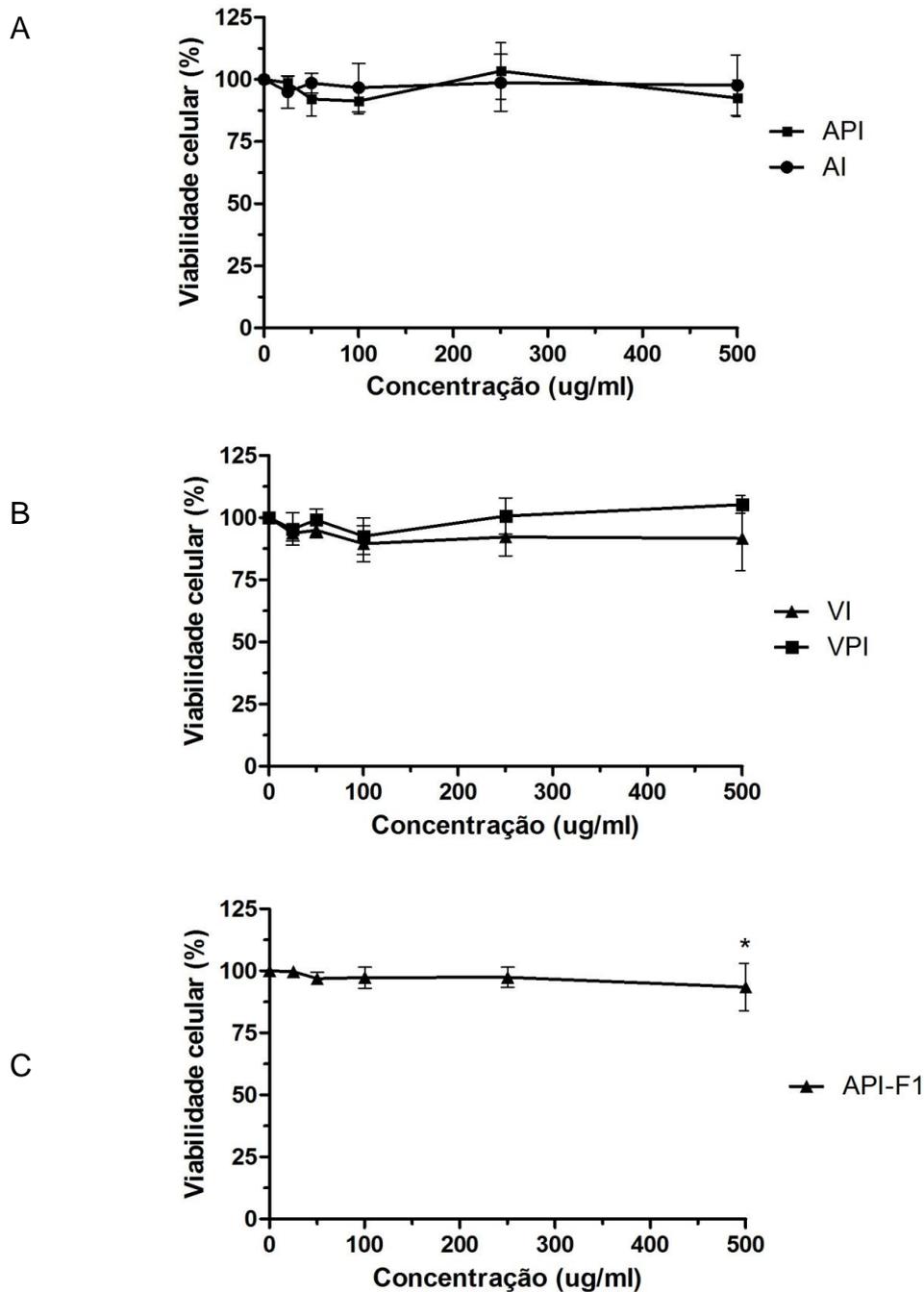


FIGURA 26 – EFEITO DAS INFUSÕES E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* E *A. absinthium* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS THP-1d PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA.

NOTA: Viabilidade das células THP-1d sob efeito das amostras AI e API (A), VI e VPI (B) e API-F1 (C). Viabilidade celular determinada pelo método do cristal violeta. Após o processo de indução da diferenciação das células THP-1 com PMA (200 nmol/l), as células THP-1d foram incubadas por 48 horas na presença dos tratamentos nas concentrações de 25, 50, 100, 250 e 500 µg/ml. Após o período de incubação com os tratamentos, as células foram fixadas com metanol e coradas com cristal violeta. Após remoção do excesso de corante com PBS, foi adicionado citrato de sódio em etanol. A absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP, de três experimentos independentes, sendo cada um em triplicata. Análise estatística realizada por *One-way ANOVA* com pós teste de Tukey. \*P < 0,05 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura).

FONTE: O autor (2012).

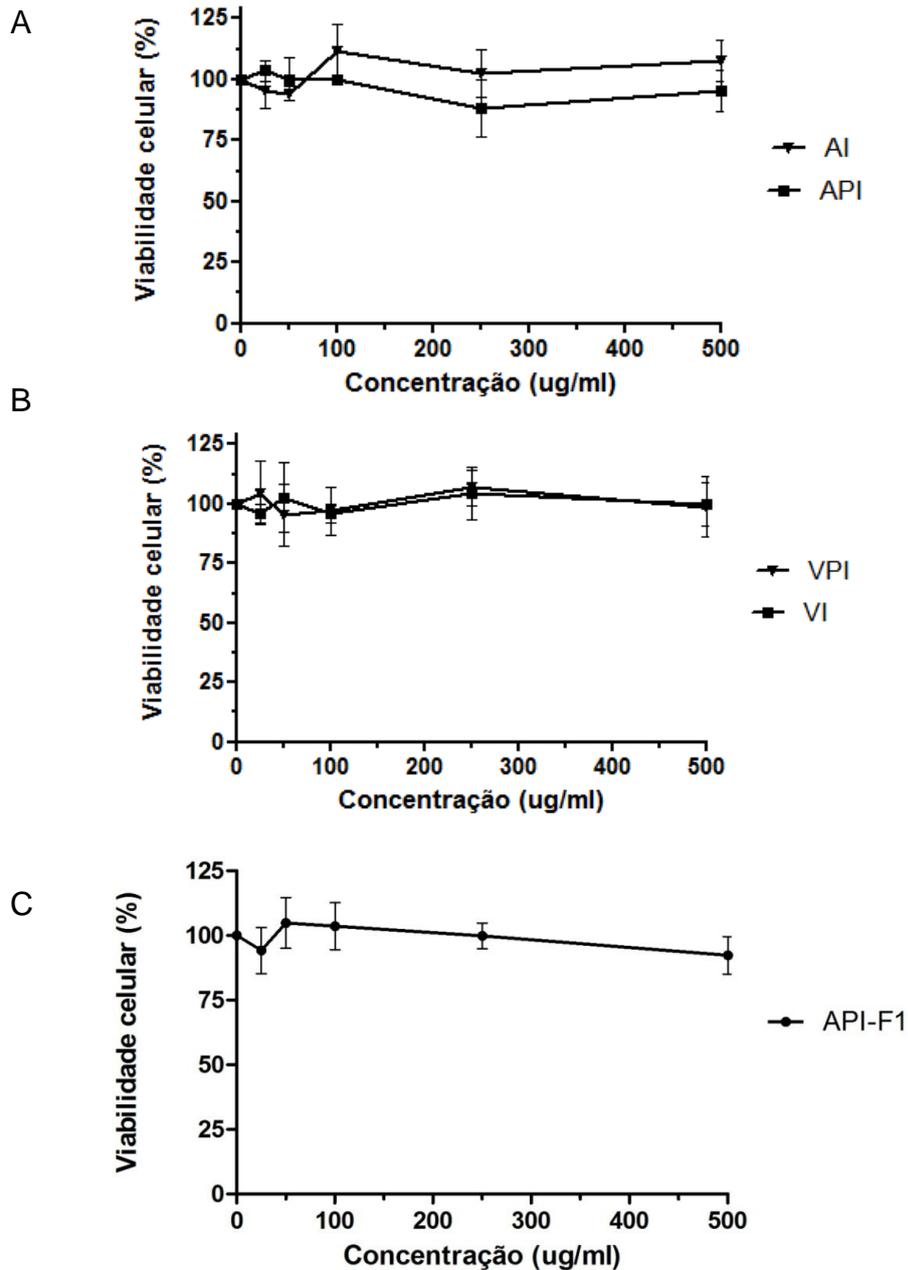


FIGURA 27 – EFEITO DAS INFUSÕES E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* E *A. absinthium* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS THP-1d PELO MÉTODO DO MTT.

NOTA: Viabilidade das células THP-1d sob efeito das amostras AI e API (A), VI e VPI (B) e API-F1 (C). Viabilidade celular determinada pelo método do MTT. Após o processo de indução da diferenciação das células THP-1 com PMA (200 nmol/l), as células THP-1d foram incubadas por 48 horas na presença dos tratamentos, nas concentrações de 25, 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$ . Após o tempo de incubação com os tratamentos, a 37 °C e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante foi retirado e adicionou-se a solução de MTT (0,5 mg/ml) em HBSS seguindo-se de incubação por mais 3 horas a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, o MTT foi retirado e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP, de três experimentos independentes, sendo cada um em triplicata. Análise estatística realizada por *One-way* ANOVA com pós teste de Tukey.

FONTE: O autor (2012).

### 5.3.2.2 Ensaio de morfologia celular

As amostras VI e AI, provenientes das infusões das ervas foram escolhidas para avaliar seus efeitos sobre a morfologia das células THP-1d diferenciadas com PMA (macrófagos). Na análise morfológica por microscopia de luz mostrada na figura 28, os tratamentos não promoveram diferenças significativas na morfologia das células quando comparados com o controle. Nestas micrografias, tanto no controle como nos tratamentos (figura 38) observa-se a presença de grande quantidade de células multinucleadas. A presença destas células gigantes multinucleadas têm sido associada com o uso de éster de forbol (PMA). Hassan *et al.* (1989) verificou que o uso de PMA em macrófagos-derivados-de-monócitos foi capaz de induzir a formação destas células gigantes *in vitro*. Os autores afirmam que estas células são formadas por fusão celular e não por ausência de divisão celular. A fusão das células foi inibida quando utilizado um inibidor da proteína quinase C (PKC), indicando um possível papel desta via na indução e formação das células gigantes multinucleadas.

A presença destas células gigantes multinucleadas *in vivo* ocorre em diversas condições inflamatórias no organismo e têm sido frequentemente associada com lesões granulomatosas formadas em resposta a corpos estranhos, vírus e bactérias (McINNES; RENNICK, 1988; HASSAN *et al.*, 1989)

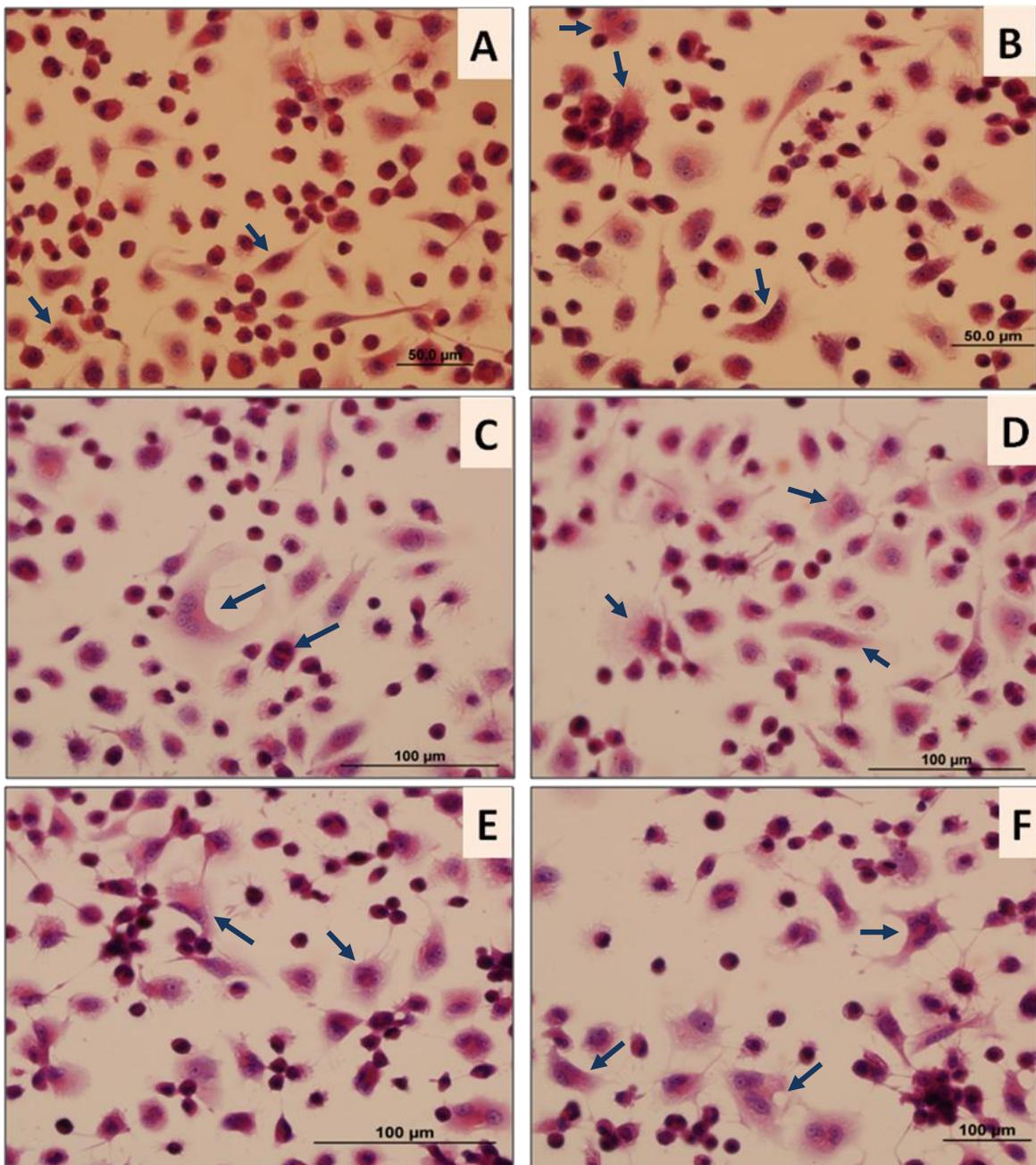


FIGURA 28 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS THP-1d TRATADAS COM AS INFUSÕES DE *A. absinthium* e *A. vulgaris*.

NOTA: As células THP-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas, na densidade de  $4 \times 10^5$  células/poço já em contato com o agente indutor da diferenciação – PMA (200 nmol/l). Após o tempo de diferenciação com o PMA, as células foram incubadas com meio RPMI - controle (A); com LPS - 100 ng/ml (B); com a infusão de *A. absinthium* (AI) na concentração de 250 µg/ml (C) e 500 µg/ml (D) e com a infusão de *A. vulgaris* 250 µg/ml (E) e 500 µg/ml (F). As lamínulas foram fixadas e em seguida coradas usando a técnica da hematoxilina-eosina. Fotografias em aumento de 400x. As setas em azul indicam as células gigantes multinucleadas.

FONTE: O autor (2012).

### 5.3.3 Células THP-1 não-diferenciadas (monócitos)

#### 5.3.3.1 Efeitos sobre a viabilidade celular

Como os ensaios do MTT e cristal violeta avaliaram a citotoxicidade dos compostos sobre as células THP-1d (macrófagos), um ensaio adicional de viabilidade por azul de tripan foi realizado sobre as células THP-1 não-diferenciadas (monócitos) para verificar se as concentrações de 250 e 500 µg/ml afetavam a viabilidade destas células. As células foram plaqueadas já expostas aos tratamentos e após 120 horas, a viabilidade das células foi verificada usando o corante de exclusão azul de tripan. A figura 29 representa a viabilidade das células em resposta aos tratamentos com as infusões e os polissacarídeos.

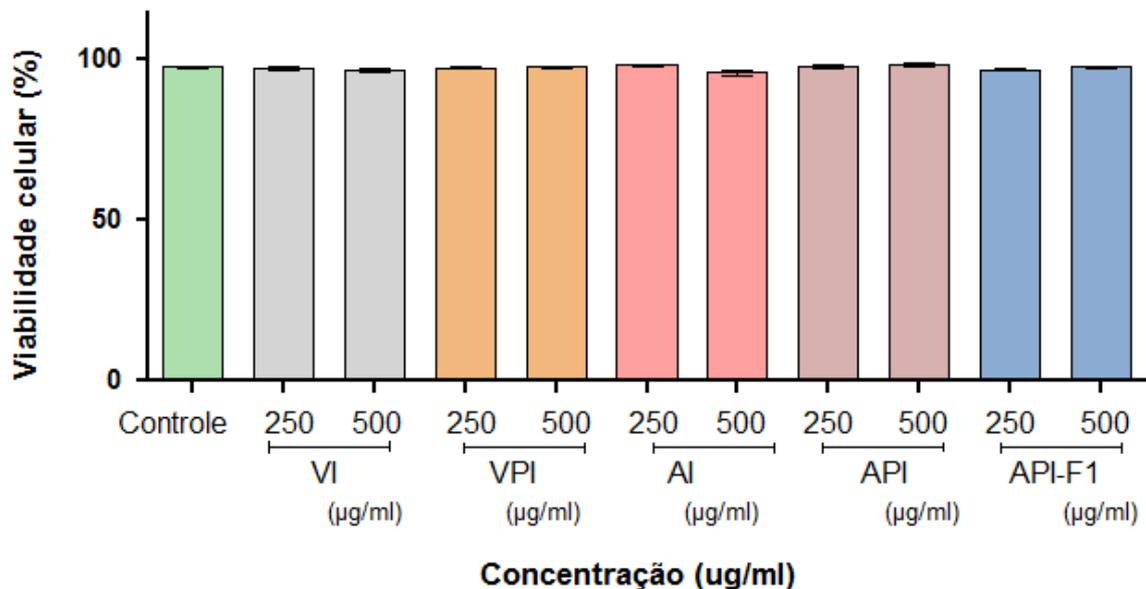


FIGURA 29 – EFEITO DAS INFUSÕES E DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* E *A. absinthium* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS THP-1 PELO MÉTODO DO AZUL DE TRIPAN.

NOTA: Viabilidade das células THP-1 sob efeito das amostras VI, VPI, AI, API e API-F1. As células THP-1 foram plaqueadas já na presença dos tratamentos e incubadas por 120 horas nas concentrações de 250 e 500 µg/ml. Após o tempo de incubação com os tratamentos, a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram coletadas, centrifugadas e ressuspensas em meio. O corante azul de tripan foi adicionado (10%) e o número de células coradas e não-coradas foi contado em câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis foi calculada pela divisão do número de células viáveis (não-coradas) pelo número total de células contadas x100. Os resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes, sendo cada um em triplicata. Análise estatística realizada por *One-way* ANOVA com pós teste de Tukey.

FONTE: O autor (2012).

É possível observar que os tratamentos não afetaram a viabilidade das células THP-1 e, portanto, as concentrações de 250 e 500 µg/ml foram utilizadas nos demais ensaios sobre as células não-diferenciadas.

### 5.3.3.2 Efeitos sobre a proliferação celular

Para verificar se as infusões e os polissacarídeos afetavam a proliferação das células de leucemia humana THP-1, estas foram plaqueadas já em contato com os tratamentos e o número de células viáveis foi contado em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de tripan, após 24, 48, 72 e 120 horas do tratamento/plaqueamento. Os resultados dos tratamentos sobre a proliferação das células THP-1 após 24 e 48 horas estão apresentados na figura 30.

Após 24 horas do tratamento com os compostos já é possível observar que a amostra VI na concentração de 500 µg/ml foi capaz de reduzir em 25% a proliferação das células THP-1. Neste mesmo tempo de tratamento, nenhuma das demais amostras afetou significativamente a proliferação celular.

No entanto, após 48 horas de tratamento, tanto a infusão de *A. vulgaris* (VI) quanto de *A. absinthium* (AI), na maior concentração utilizada (500 µg/ml), afetaram a proliferação celular, sendo que para a amostra VI este efeito foi mais pronunciado, reduzindo o número de células leucêmicas em 40,5% e para a amostra AI esta redução foi de 25,4%. Nota-se que na concentração de 250 µg/ml a amostra VI não foi capaz de reduzir significativamente a proliferação das células THP-1 em 48 horas, indicando que seu efeito é dose-dependente.

Os resultados dos tratamentos sobre a proliferação das células THP-1 após 72 e 120 horas estão apresentados na figura 31. Após 72 horas de tratamento, o efeito das infusões sobre a proliferação quase não se alterou em relação ao tempo de 48 horas, sendo que a amostra AI apresentou uma redução de 25% na proliferação celular e a amostra VI reduziu em 41,3%.

No último dia de tratamento (120 horas), além das infusões, o polissacarídeo da infusão de *A. absinthium* (API) também foi capaz de reduzir em 18% a proliferação das células THP-1. Nesta mesma condição, AI foi capaz de promover uma redução de 42,6% na proliferação celular, similar ao efeito observado para a amostra VI, que reduziu em 46% a proliferação das células THP-1.

A infusão de *A. vulgaris* é constituída por 40% de carboidratos e assemelha-se muito ao polissacarídeo da infusão desta espécie, como observado pelo espectro de RMN-  $^{13}\text{C}$ . No entanto, o polissacarídeo bruto VPI não foi capaz de interferir na proliferação das células THP-1 *in vitro*, o que indica que, neste caso, os compostos de baixa massa são provavelmente os responsáveis pelo efeito observado para a infusão.

Com relação à *A. absinthium*, os resultados obtidos sobre a proliferação celular sugerem que os polissacarídeos presentes na infusão exercem um efeito sinérgico aos compostos de baixa massa molar presentes na infusão de *A. absinthium*, pois a fração polissacarídica isolada da infusão (API) apresentou redução de 18% sobre a proliferação das células após 120 horas de tratamento, enquanto que a infusão promoveu uma redução muito maior na proliferação (42,6%).

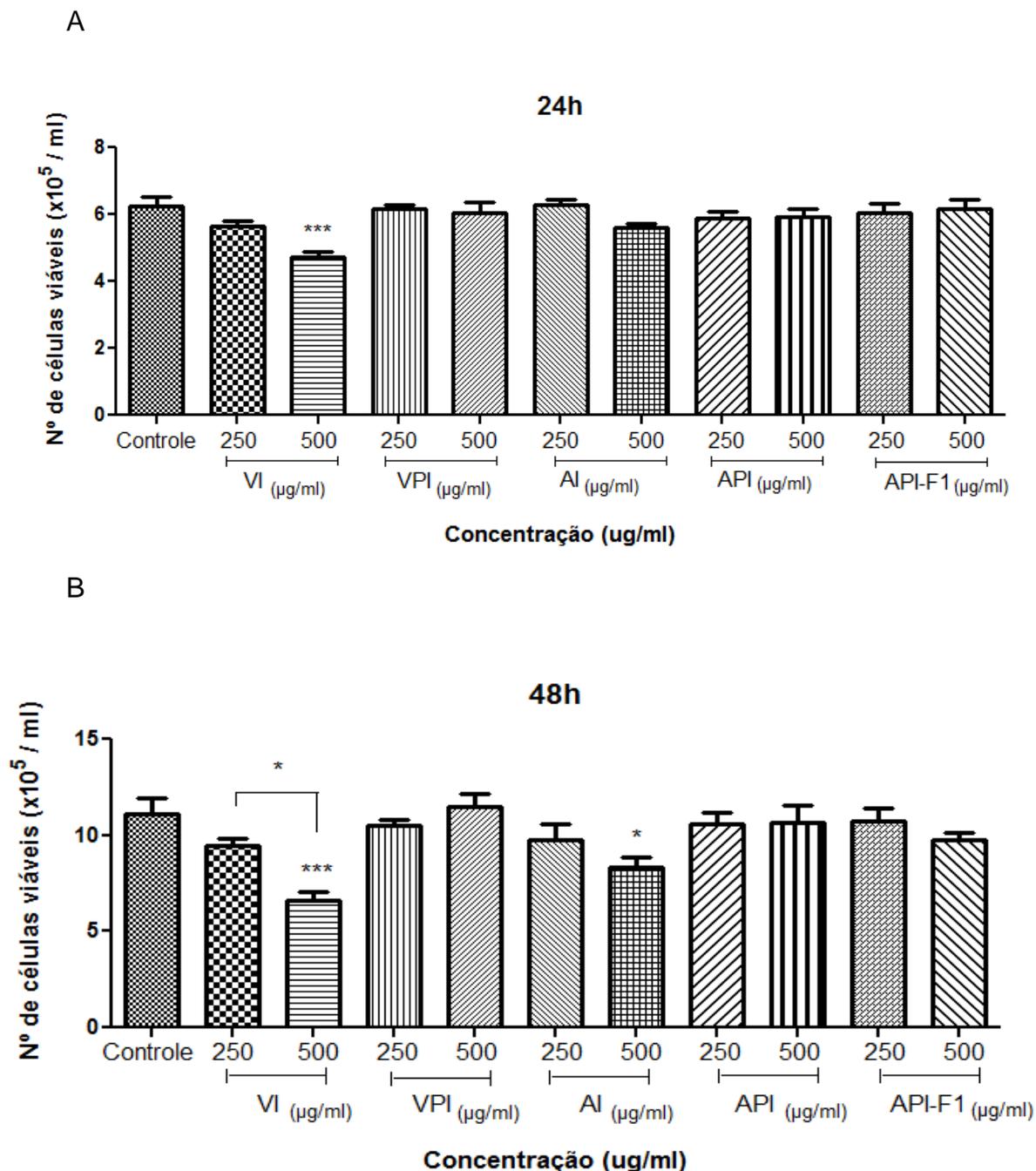
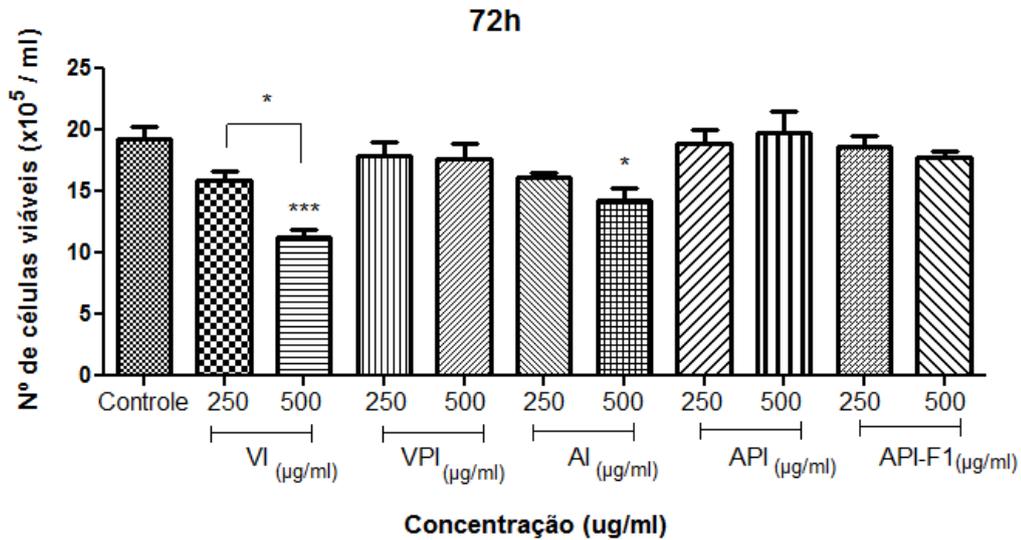


FIGURA 30 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS E DAS INFUSÕES OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* e *A. absinthium* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 *IN VITRO* APÓS 24 HORAS (A) E 48 HORAS (B) DE TRATAMENTO.

NOTA: Proliferação das células THP-1 após 24 e 48 horas de tratamento com os polissacarídeos brutos, as infusões e a fração API-F1 nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$ . O efeito dos compostos na proliferação das células THP-1 foi verificado por contagem em câmara de Neubauer do número de células viáveis, após 24 e 48 horas de tratamento, utilizando o corante de exclusão azul de tripan. Os dados apresentados são de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP. Análise estatística realizada por *One-way* ANOVA com pós teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura) ou entre os grupos conectados pela linha traçada.

FONTE: O autor (2012).

A



B

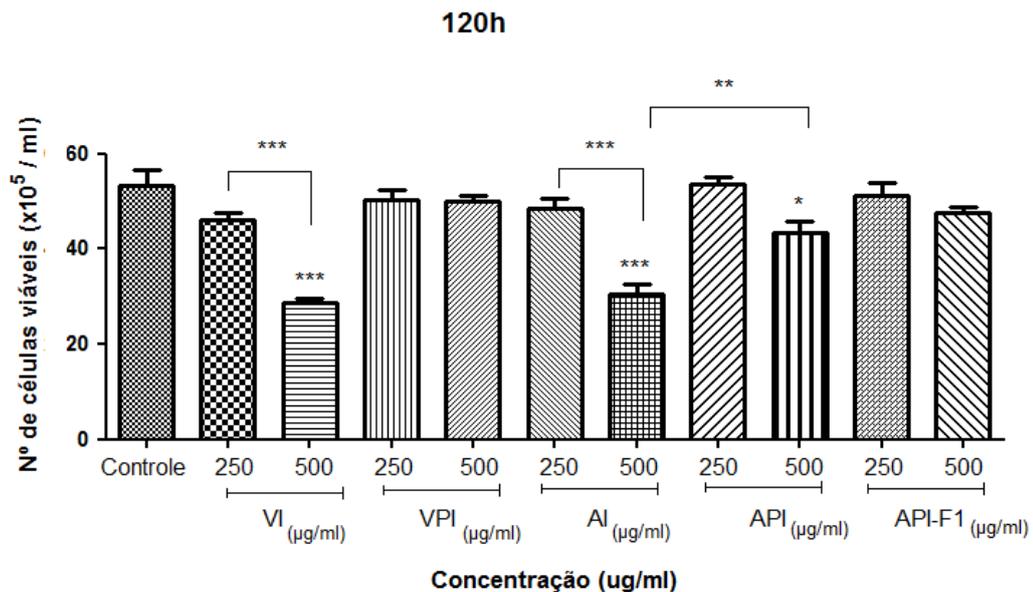


FIGURA 31 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS E DAS INFUSÕES OBTIDOS DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* e *A. absinthium* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 *IN VITRO* APÓS 72 HORAS (A) E 120 HORAS (B) DE TRATAMENTO.

NOTA: Proliferação das células THP-1 após 72 e 120 horas de tratamento com os polissacarídeos brutos, as infusões e a fração API-F1 nas concentrações de 250 e 500 µg/ml. O efeito dos compostos na proliferação das células THP-1 foi verificado por contagem do número de células viáveis, após 72 e 120 horas de tratamento, em câmara de Neubauer utilizando o corante de exclusão azul de tripan. Os dados apresentados são de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. Os resultados estão expressos como média ± DP. Análise estatística realizada por *One-way* ANOVA com pós teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura) ou entre os grupos conectados pela linha traçada.

FONTE: O autor (2012)

### 5.3.3.3 Análise do ciclo celular

Os mecanismos moleculares de proliferação celular são extremamente complexos e finamente regulados. Durante a proliferação celular, as células passam por uma sequência de eventos, os quais constituem o ciclo celular (figura 32) (TRAORE *et al.*, 2005). A progressão através de cada fase do ciclo celular e a transição de uma fase para outra é regulada por “mecanismos sensores”, chamados *checkpoints*, que vão determinar se uma célula entra na próxima fase do ciclo ou não (WILLIAMS; STOEBER, 2012). Nas fases G1 e S, fatores de crescimento, como produtos de oncogenes, irão promover a multiplicação celular, enquanto que produtos de genes supressores tumorais inibem a proliferação, interrompendo a progressão do ciclo quando há danos no DNA, até que estes sejam reparados. A perda no controle do ciclo celular, por super-ativação de proto-oncogenes ou por mutação e consequente perda de função dos genes supressores tumorais, desencadeia proliferação celular aberrante que caracteriza o câncer (ALMEIDA *et al.*, 2005).

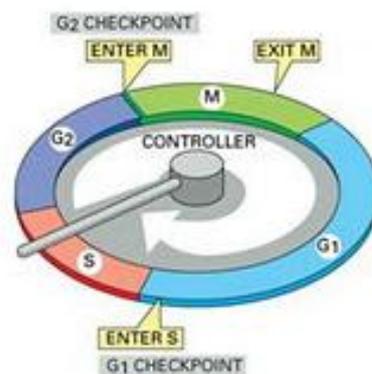


FIGURA 32 – ILUSTRAÇÃO DO CICLO CELULAR E SUAS FASES.

FONTE: BIOLOGIA CELULAR INTERATIVA. Disponível em: <<http://biocelinterativa.blogspot.com/2009/04/ciclo-celular.html>>. Acesso em 13/01/2012.

Assim, a busca por compostos que promovam parada no ciclo celular de células tumorais é uma alternativa interessante no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento do câncer.

Dessa forma, como as amostras AI e VI na concentração de 500 µg/ml foram capazes de reduzir significativamente a proliferação das células THP-1, estes compostos foram avaliados quanto ao seu efeito sobre o ciclo celular, com o objetivo de compreender o mecanismo de ação da citotoxicidade. Como os compostos já haviam apresentado redução na proliferação das células a partir de 48 horas, este tempo de tratamento foi escolhido para análise de ciclo celular.

Os resultados obtidos estão representados nas figuras 33 e 34, que apresentam respectivamente o gráfico com as proporções das células em cada fase do ciclo celular e os histogramas representativos dos três experimentos independentes.

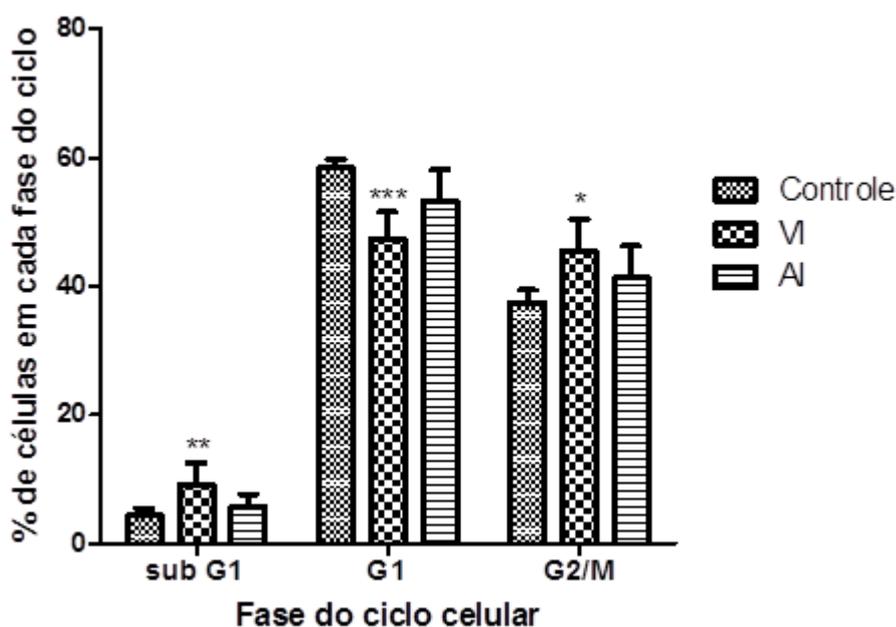


FIGURA 33 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS THP-1 NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AS INFUSÕES DE *A. absinthium* e *A. vulgaris*.

NOTA: Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com a infusão de *A. absinthium* (AI) e *A. vulgaris* (VI) na concentração de 500 µg/ml. Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os resultados estão expressos como média ± DP. Análise estatística realizada por *One-way ANOVA* com pós teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura).

FONTE: O autor (2012).

Estes resultados indicam que o tratamento com VI na concentração de 500 µg/ml interfere na progressão do ciclo celular, devido ao aumento significativo na

proporção de células na fase sub-G1 e G2/M do ciclo, reduzindo proporcionalmente a fase G1. Apesar da amostra AI apresentar a mesma tendência em aumentar a porcentagem de células na fase sub-G1 e G2/M, este aumento não foi estatisticamente significativo, provavelmente porque esta amostra só apresentou uma diminuição expressiva na proliferação das células THP-1 após 120 horas de tratamento.

Quando as células THP-1 são tratadas com VI na concentração de 500 µg/ml por 48 horas, há um aumento estatisticamente significativo na porcentagem de células na fase sub-G1 de 4,4% (controle) para 9,2% no tratamento com VI.

A fase sub-G1 do ciclo representa a população de células com conteúdo de DNA hipo-diplóide, ou seja, células que apresentam fragmentação de DNA. Tem sido proposto que o aumento na proporção de células nesta fase é um indício da ocorrência de morte celular por apoptose desencadeada pelo composto em estudo (LIM *et al.*, 2003). A morte celular por apoptose, também chamada de morte celular programada, é um dos mecanismos de morte celular, no qual a própria célula organiza e executa seu processo de morte. Uma característica indicativa do processo de apoptose é a fragmentação do DNA celular, promovido por endonucleases, ativadas no processo de morte programada. Por isso, células em processo de apoptose, apresentam reduzido conteúdo de DNA e quando analisadas por citometria de fluxo, localizam-se entre a população de células da fase sub-G1. No entanto, nem todos os eventos incluídos na fase sub-G1 representam células apoptóticas, podem também estar incluídas células *debris* (LOO; RILLEMA, 1998).

O aumento na proporção de células na fase sub-G1 do ciclo, promovido pelo tratamento com VI, pode indicar indução de apoptose nas células THP-1. Como as células apoptóticas, diferentemente das células necróticas, mantêm a integridade da membrana celular durante o processo de morte, ensaios de viabilidade como o azul de tripan subestimam o número de células em processo de morte, já que as células em apoptose continuam capazes de excluir o corante (LOO; RILLEMA, 1998). Isto pode ser uma explicação para o fato de a amostra VI não afetar a viabilidade das células no ensaio do azul de tripan, mas aumentar a proporção de células na fase sub-G1.

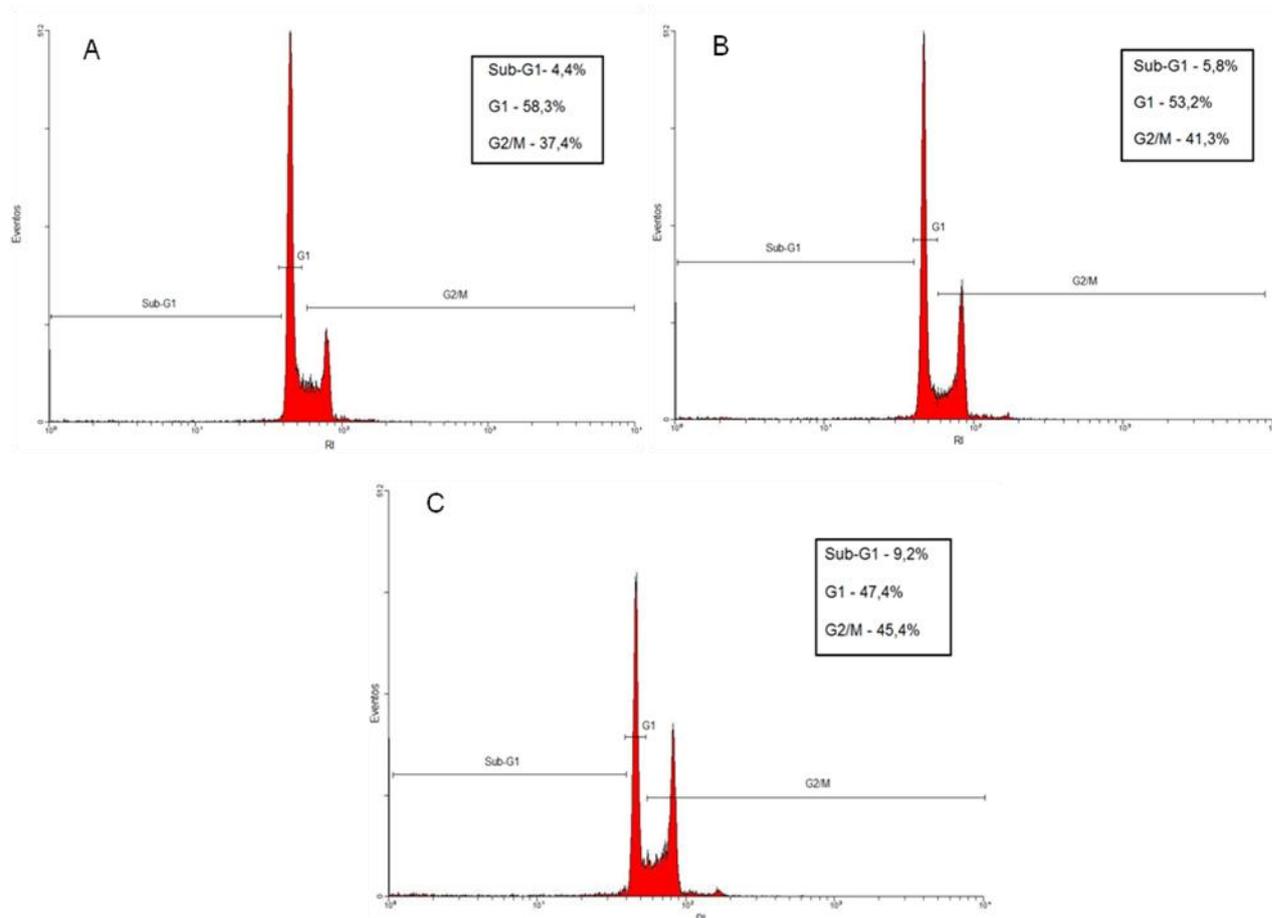


FIGURA 34 - ANÁLISE DE CICLO CELULAR DA LINHAGEM THP-1.

NOTA: Histogramas representativos das células THP-1 tratadas com as infusões de *A. absinthium* e *A. vulgaris* por 48 horas. (A) Condição controle, células cultivadas sem nenhum tratamento (somente meio de cultura); (B) Células tratadas com a infusão de *A. absinthium* (AI) na concentração de 500 µg/ml; (C) Células tratadas com a infusão de *A. vulgaris* (VI) na concentração de 500 µg/ml. As regiões delimitadas nas figuras correspondem às fases do ciclo celular. No quadrado em destaque está apresentado o número de células em porcentagem em cada fase do ciclo celular. Os valores são referentes à média de três experimentos independentes realizados em duplicatas.

FONTE: O autor (2012)

Como mostrado nas figuras 33 e 34, a amostra VI também foi capaz de induzir o acúmulo das células THP-1 na fase G2/M do ciclo celular, a quantidade de células passou de 37,4% (controle) para 45,4% (VI 500 µg/ml). O acúmulo de células na fase G2/M também foi observada em células expostas a irradiação  $\gamma$ , agente que provoca danos ao DNA (HYUN *et al.*, 2002). Segundo os autores, a maioria das células que se acumulam na fase G2/M não entra em mitose, mas sofrem morte celular por apoptose. A linhagem THP-1, assim como a linhagem U937 usada no estudo de Hyun *et al.* (2002) apresentam mutação no gene supressor de tumor p53, o qual é responsável por bloquear o ciclo celular na fase G1 quando as células

apresentam dano no DNA, impedindo assim a proliferação de células com material genético anormal. Quando as células não apresentam o fator de transcrição p53 funcional, as células não interrompem o ciclo celular em G1, mas se acumulam na próxima fase do ciclo – G2/M. Os autores sugerem que a radiação sobre as células leucêmicas U937 induz primeiramente parada das células na fase G2/M do ciclo, em decorrência do dano causado ao material genético e, em seguida, promove morte celular por apoptose.

O aumento na proporção de células nas fases sub-G1 e G2/M do ciclo também foi observado por Lim *et al.* (2003), quando as células THP-1 foram tratadas com oxisteróis (derivados do colesterol). Os autores sugerem que a indução de apoptose promovida pelos compostos foi resultado da diminuição dos níveis da proteína Bcl-2, uma proteína antiapoptótica, que forma um heterodímero com a proteína pró-apoptótica – Bax. A proporção intracelular destas duas proteínas determina a sensibilidade ou resistência da célula a um estímulo apoptótico. Como verificado experimentalmente, os oxisteróis promovem a diminuição dos níveis de Bcl-2 mas não de Bax, tornando a célula mais sensível à morte celular por apoptose. Com relação ao acúmulo das células THP-1 na fase G2/M do ciclo, o mecanismo molecular proposto pelos autores foi que os oxisteróis promovem diminuição dos níveis de ciclina B1, a qual juntamente com as proteínas cdc2 e ciclina A são responsáveis pela progressão da fase G2/M do ciclo celular.

Propriedades antitumorais de plantas do gênero *Artemisia* já foram comprovadas anteriormente. O extrato aquoso de *A. vulgaris* exerceu potente efeito inibitório no crescimento e formação de colônia em células de câncer de próstata, mama e colorretal, através da indução de apoptose, a qual foi verificada pela ativação (clivagem) de caspase-3 e também clivagem da enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). A caspase-3 está envolvida na fase de execução da apoptose, sendo responsável pela clivagem de diversos substratos, incluindo a enzima PARP. (NAWAB *et al.*, 2011).

O composto artesunato, um derivado semi-sintético da artemisina, lactona sesquiterpênica isolada de *Artemisia annua*, induziu parada das células de câncer de pulmão na fase G2/M do ciclo celular. Este efeito tornou as células mais sensíveis à radioterapia, porque as células tumorais acumuladas nesta fase do ciclo celular são mais sensíveis à irradiação do que nas demais fases (ZHAO *et al.*, 2011).

### 5.3.3.4 Efeitos sobre a diferenciação celular

Uma recente abordagem no tratamento da leucemia monocítica é o uso de compostos que sejam capazes de induzir as células imaturas do câncer, paradas em algum ponto do processo de diferenciação, a terminarem de se diferenciar em macrófagos, cessando assim a proliferação celular (WU; LEE, 2011).

Com este objetivo, as células THP-1 foram tratadas por 120 horas com os compostos AI, VI, API, VPI e API-F1 nas concentrações de 250 e 500 µg/ml. Após o período de incubação as células foram fotografadas em microscópio invertido a fim de identificar mudanças na morfologia celular. Os resultados deste ensaio estão representados nas figuras 35, 37 e 38.

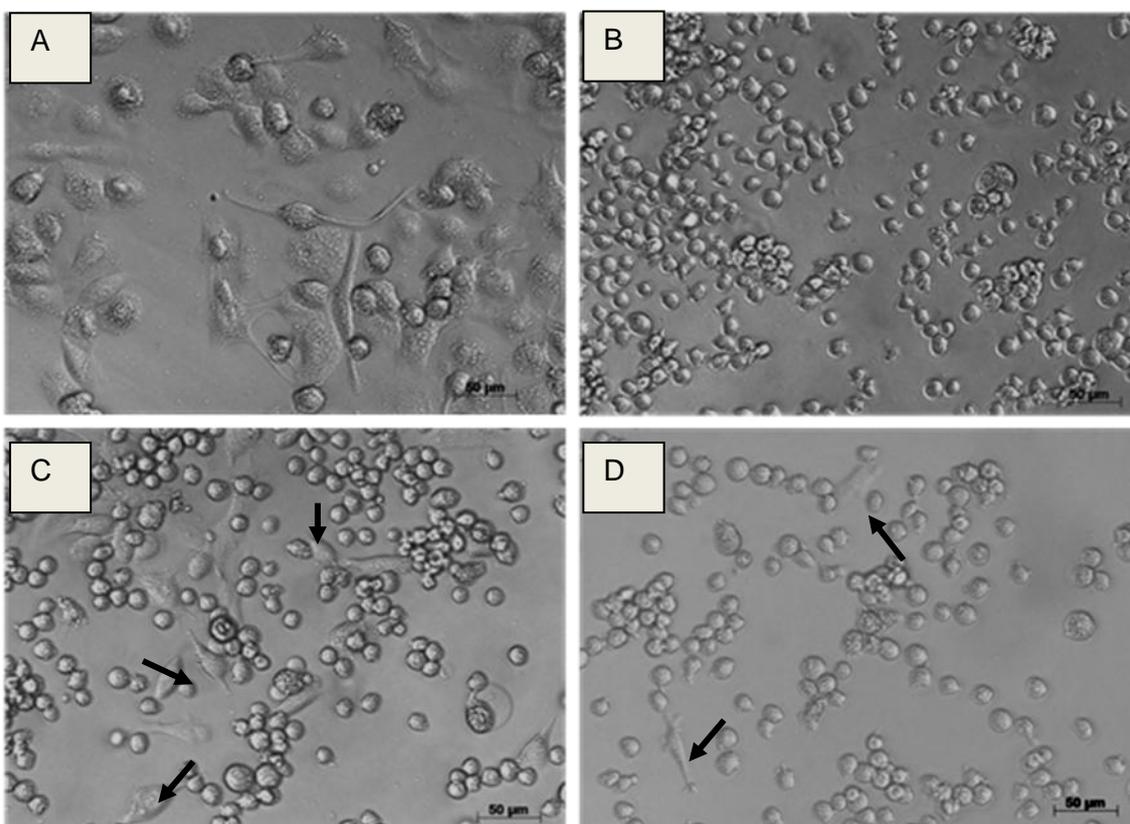


FIGURA 35 - EFEITO DA INFUSÃO PREPARADA A PARTIR DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium* (AI) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1.

NOTA: Ensaio de diferenciação celular. As células THP-1 foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços, já em contato com a infusão de *A. absinthium*, nas concentrações de 250 e 500 µg/ml. Como controle positivo foi usado o PMA e negativo, somente o meio RPMI. As células foram incubadas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 5 dias, as células foram observadas em microscópio invertido e fotografadas no aumento de 200x. (A) PMA – Controle positivo; (B) Meio RPMI – Controle negativo; (C) AI 250 µg/ml; (D) AI 500 µg/ml. As fotografias são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicatas. As setas pretas indicam as células diferenciadas, aderidas à placa.

FONTE: O autor (2012)

Todos os compostos avaliados foram capazes de induzir a diferenciação das células THP-1, de monócitos para macrófagos. Isto ficou evidente pela mudança de morfologia de algumas células, as quais passaram a se assemelhar mais a macrófagos, aumentando o volume citoplasmático e passando a aderir na placa (AUWERX, 1991). Além disso, também foi possível observar o surgimento de inúmeros grânulos citoplasmáticos, como pode ser observado na figura 36, os quais são decorrentes do aumento de organelas, como lisossomos e mitocôndrias, essenciais para as funções dos macrófagos (DAIGNEAULT *et al.*, 2010).

A diferenciação de um progenitor celular não-diferenciado em uma célula madura, com fenótipo biologicamente funcional é um processo altamente complexo e regulado. A diferenciação de monócitos em macrófagos *in vivo* requer uma ampla variedade de fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interleucina 3 e fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), os quais são necessários em vários estágios da diferenciação dos monócitos, atuando de forma sinérgica (ABE *et al.*, 1991; CHEN-DEUTSCH *et al.*, 2009).

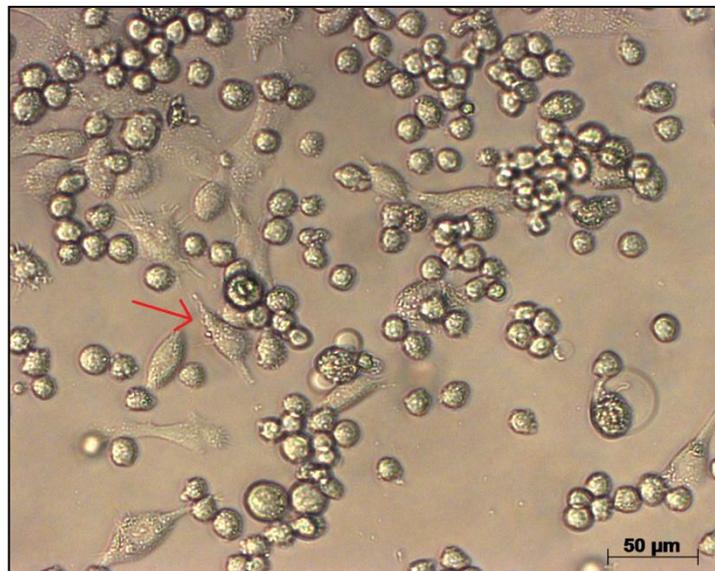


FIGURA 36 – MUDANÇA DE MORFOLOGIA DAS CÉLULAS THP-1 EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM A INFUSÃO DE *A. absinthium*.

NOTA: Ensaio de diferenciação celular. A seta vermelha indica uma célula THP-1 diferenciada em macrófago, apresentando morfologia típica, numerosos grânulos citoplasmáticos, adesão à placa e expansão citoplasmática. Neste ensaio as células THP-1 foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços, já em contato com a infusão de *A. absinthium*, na concentração de 250 µg/ml. As células foram incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após 5 dias, as células foram observadas em microscópio invertido e fotografadas no aumento de 200x.

FONTE: O autor (2012)

O mecanismo molecular pelo qual os extratos avaliados no presente estudo promoveram a diferenciação das células THP-1 é desconhecido, mas provavelmente é resultado de um processo que envolve diversas vias metabólicas.

Indutores da diferenciação exógenos, como a 1,25 dihidroxivitamina D3, podem atuar através da regulação de diversas vias, como a via da proteína quinase C, a via metabólica fosfatidilinositol 3-quinase / proteína serina-treonina quinase (*PI3/AKT*) e também através da via da proteína quinase ativada por mitógenos (*MAPK*) (Revisado por CHEN-DEUTSCH et al., 2009). Recentemente, estudos têm mostrado que microRNAs também estão envolvidos no processo de indução da diferenciação de células de leucemia mielóide pela 1,25 dihidroxivitamina D3 (*WANG et al., 2009*). Assim, os estudos mostram que a capacidade de a 1,25 dihidroxivitamina D3 induzir a diferenciação de monócitos a macrófagos, oferece uma alternativa promissora e menos tóxica para o tratamento da leucemia mielóide aguda (CHEN-DEUTSCH et al., 2009).

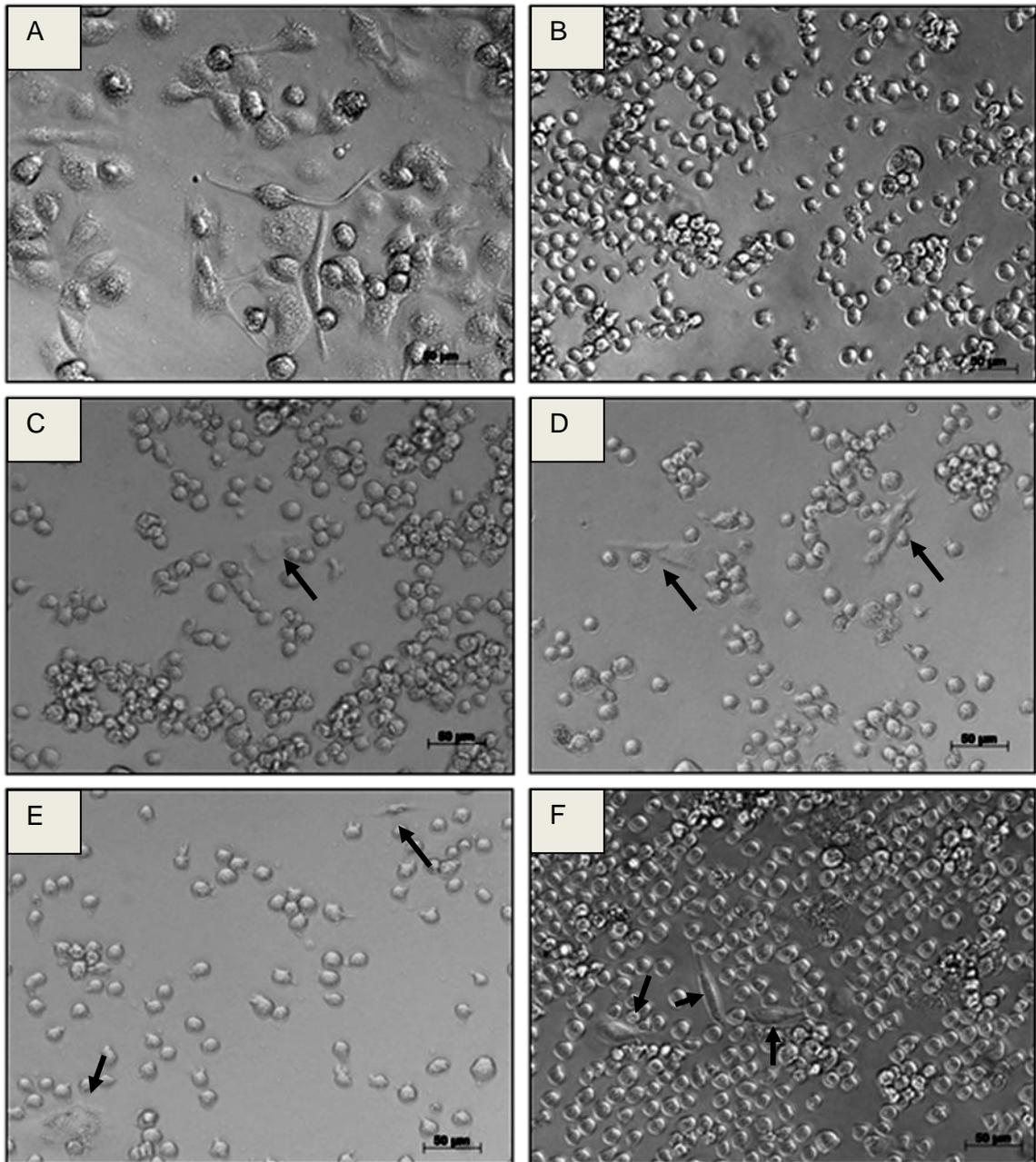


FIGURA 37 - EFEITO DO POLISSACARÍDEO BRUTO OBTIDO DA INFUSÃO DA PARTE AÉREA DE *A. absinthium* (API) E DA FRAÇÃO PURIFICADA (API-F1) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1.

NOTA: Ensaio de diferenciação celular. As células THP-1 foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços, já em contato com o polissacarídeo bruto da infusão e a fração purificada, obtidos das folhas de *A. absinthium*, nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$ . Como controle positivo foi usado o PMA e negativo, somente o meio RPMI. As células foram incubadas a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 5 dias, as células foram observadas em microscópio invertido e fotografadas no aumento de 200x. (A) PMA – Controle positivo; (B) Meio RPMI – Controle negativo; (C) API 250  $\mu\text{g/ml}$ ; (D) API 500  $\mu\text{g/ml}$ ; (E) API-F1 250  $\mu\text{g/ml}$ ; (F) API-F1 500  $\mu\text{g/ml}$ . As fotografias são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicatas. As setas pretas indicam as células diferenciadas, aderidas à placa.

FONTE: O autor (2012)

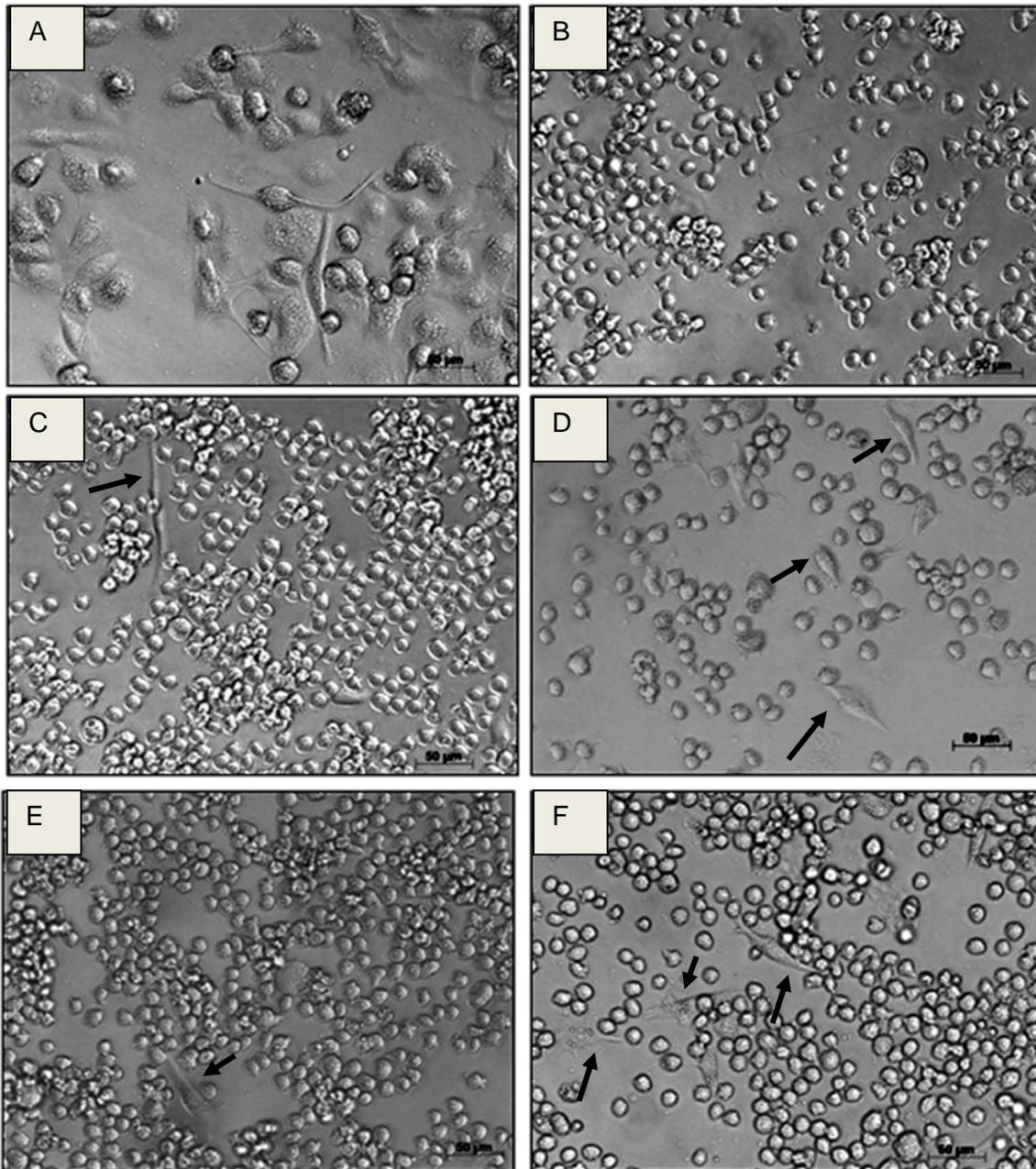


FIGURA 38 - EFEITO DA INFUSÃO PREPARADA A PARTIR DA PARTE AÉREA DE *A. vulgaris* (VI) E DO POLISSACARÍDEO BRUTO (VPI) SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1.

NOTA: Ensaio de diferenciação celular. As células THP-1 foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços, já em contato com a infusão e o polissacarídeo bruto de *A. vulgaris*, nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$ . Como controle positivo foi usado o PMA e negativo, somente o meio RPMI. As células foram incubadas a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 5 dias, as células foram observadas em microscópio invertido e fotografadas no aumento de 200x. (A) PMA – Controle positivo; (B) Meio RPMI – Controle negativo; (C) VI 250  $\mu\text{g/ml}$ ; (D) VI 500  $\mu\text{g/ml}$ ; (E) VPI 250  $\mu\text{g/ml}$ ; (F) VPI 500  $\mu\text{g/ml}$ . As fotografias são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicatas. As setas pretas indicam as células diferenciadas, aderidas à placa.

FONTE: O autor (2012)

Wu e Lee (2011) também observaram que um polissacarídeo bruto isolado de sementes de *Fagopyrum tataricum* foi capaz de induzir a diferenciação das células THP-1 a macrófagos, mas os mecanismos pelos quais o polissacarídeo desencadeou a diferenciação não estão esclarecidos.

Os polissacarídeos e as infusões de *A. absinthium* e *A. vulgaris*, avaliados neste estudo, não demonstraram ser citotóxicos para as células THP-1, mas promoveram uma redução na proliferação e induziram a diferenciação destas células. Assim, estes resultados mostram que estes extratos podem ser potencialmente úteis e seguros como tratamento complementar da leucemia mielóide aguda, em especial as infusões, as quais são formas fáceis de preparar e utilizar.

#### 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Plantas medicinais são uma alternativa comum na prevenção ou tratamento do câncer em muitos países (NAWAB *et al.*, 2011). Além disso, constituem uma fonte importante para descoberta de novas estruturas químicas que podem ser usadas como modelos para síntese de compostos análogos semi-sintéticos mais eficazes contra as células do câncer. Atualmente, produtos obtidos a partir de fontes naturais ou compostos modelados a partir de compostos químicos encontrados na natureza, compreendem cerca de 50% das drogas que são usadas na quimioterapia contra o câncer (MANN, 2002).

Polissacarídeos obtidos de diversas fontes vegetais têm mostrado atividade antitumoral sobre diferentes tipos de câncer como câncer gástrico (XU *et al.*, 2011), câncer de mama (TAPER; ROBERFROID, 1999) e também sobre células de leucemia humana (WU; LEE, 2011).

Neste trabalho, a partir da infusão de *A. absinthium* foram obtidos polissacarídeos por precipitação etanólica, sendo que desta fração polissacarídica bruta (API) foi isolada uma arabinogalactana-proteína (AGP) que representa 6% do total de polissacarídeos obtidos por infusão. Esta AGP apresentou massa molar de 84.160 g/mol e nos ensaios de atividade antitumoral *in vitro* sobre as células de leucemia humana (THP-1), esta fração pura não apresentou efeito sobre a

proliferação celular, mas foi capaz de induzir a diferenciação terminal destas células à macrófagos. A fração polissacarídica bruta (API) desta espécie, além de induzir a diferenciação celular, também reduziu a proliferação das células em 18,7% após 120 horas de tratamento, na maior dose testada (500 µg/ml).

A fração polissacarídica obtida por precipitação etanólica da infusão de *A. vulgaris* (VPI) mostrou ser constituída majoritariamente (85%) por frutanas. A comparação do espectro de RMN- <sup>13</sup>C desta amostra com frutanas isoladas de outras espécies (FONTANA *et al.*, 1994; CHANDRASHEKAR; PRASHANTH; VENKATESH, 2011), permitiu classificar estas frutanas como inulina, um carboidrato de reserva constituído por unidades de D-frutose unidas por ligação β(2→1). Em relação aos efeitos biológicos, esta fração polissacarídica bruta foi capaz de induzir a diferenciação das células THP-1 *in vitro*.

Neste trabalho, as infusões de *A. absinthium* (AI) e *A. vulgaris* (VI) também foram avaliadas e exibiram efeitos significativos em relação à atividade antitumoral sobre as células de leucemia humana (THP-1). No tempo de tratamento de 120 horas, a dose de 500 µg/ml da infusão de *A. absinthium* foi capaz de reduzir em 42,6% a proliferação celular e, nesta mesma dose, a infusão de *A. vulgaris* reduziu em 46% a proliferação das células. Quimicamente, a infusão da parte aérea de *A. absinthium* é composta por 9,2% de carboidratos, 2,7% de proteínas e 3,7% de compostos fenólicos. Já a infusão de *A. vulgaris* é composta predominantemente por polissacarídeos (40%), os quais foram identificados como inulina.

Como as infusões das ervas apresentaram um efeito antitumoral mais pronunciado do que as frações polissacarídicas isoladas, acredita-se que o efeito antiproliferativo promovido pelas infusões sobre as células THP-1 provavelmente são resultado de um efeito sinérgico dos vários metabólitos presentes nestes extratos.

Dentre os compostos antitumorais já caracterizados para o gênero *Artemisia* estão os monoterpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos (TAN; ZHENG; TANG, 1998). É geralmente aceito que flavonóides, os quais também estão presentes em extratos destas plantas, previnem, atrasam e ajudam a curar o câncer (FERREIRA *et al.*, 2010). Amstalden (2011) demonstrou que o flavonóide quercetina, foi capaz de diminuir a proliferação e induzir parada do ciclo celular em gliomas humanos. Em outro estudo foi mostrado que lactonas sesquiterpênicas,

características de extratos de *Artemisia*, mostraram potente atividade antitumoral sobre diversos tipos de câncer (TIN *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2011).

Os resultados do presente estudo com as células THP-1, sugerem que as infusões de *A. absinthium* e *A. vulgaris* podem auxiliar no tratamento de leucemias, em especial na leucemia mielóide aguda. No entanto, estudos adicionais sobre estes extratos devem ser realizados, já que a composição destas infusões mostra-se bastante complexa, podendo conter substâncias tóxicas ao organismo, como o composto tujona, comumente presente em preparações destas ervas, para o qual já foram descritas atividades neurotóxicas (LACHENMEIER, 2010).

## 6 CONCLUSÕES

- A partir da infusão da parte aérea de *A. absinthium* foram obtidos polissacarídeos, sendo que desta fração bruta foi isolada e caracterizada uma arabinogalactana-proteína (AGP), que representa 6% do total dos polissacarídeos obtidos da infusão.

- Nos ensaios de atividade biológica *in vitro* tanto a fração polissacarídica bruta quanto a infusão da parte aérea de *A. absinthium*, na concentração de 500 µg/ml, foram capazes de inibir a proliferação das células de leucemia humana (THP-1) em 18% e 42,6%, respectivamente. O efeito antiproliferativo da infusão foi mais pronunciado que o efeito do polissacarídeo, sugerindo que os polissacarídeos da infusão exercem um efeito sinérgico aos compostos de baixa massa molar, também presentes nesta fração.

- A infusão da parte aérea de *A. vulgaris*, bem como o polissacarídeo bruto obtido a partir desta infusão apresentaram como componente principal a inulina. Entretanto, somente a infusão de *A. vulgaris* foi capaz de reduzir a proliferação das células de leucemia humana (THP-1) em 46%, sugerindo que o efeito observado está associado somente à ação dos compostos de baixa massa molar presentes na infusão desta espécie.

- No ensaio de diferenciação celular, as infusões de *A. absinthium* e *A. vulgaris*, os polissacarídeos brutos das duas espécies e a AGP, induziram a diferenciação terminal das células THP-1.

- Baseados nestes resultados pode-se concluir que as infusões de *A. absinthium* e *A. vulgaris*, podem auxiliar no tratamento de leucemias, em especial na leucemia mielóide aguda, afetando diretamente a proliferação celular e também induzindo a diferenciação dos monócitos imaturos em macrófagos, resultando em parada na proliferação. Estes efeitos, conforme verificado no estudo, podem ser decorrentes tanto da ação dos compostos de baixa massa molar quanto dos polissacarídeos presentes nas infusões destas espécies.

## REFERÊNCIAS

- ABE, T.; OHNO, M.; SATO, T.; MURAKAMI, M.; KAJIKI, M.; KODAIRA, R. "Differentiation Induction" culture of human leukemic myeloid cells stimulates high production of macrophage differentiation inducing factor. **Cytotechnology**, v. 5, suplem. 2, p. 75-93, 1991.
- ABERHAM, A.; CICEK, S.S.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Analysis of sesquiterpene lactones, lignans, and flavonoids in wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Mass Spectrometry, Reversed Phase HPLC, and HPLC-Solid Phase Extraction-Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 10817–10823, 2010.
- ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 269-276, 1965.
- ALMAJANO, M.P.; ROSA CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, J.A.L.; GORDON, M.H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 55-63, 2008.
- ALMEIDA, V.L.de.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMAT, N., UPUR, H., BLAZEKOVIĆ, B. In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 478-484, 2010.
- AMSTALDEN, H.G. **Efeitos da quercetina em células de glioma humano: envolvimento de metaloproteinases de matriz e seus inibidores**. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ARNOLD, W.N. Vincent van Gogh and the thujone connection. **Journal of the American Medical Association**, v. 260, n. 20, p. 3042-3044, 1988.

AUWERX, J. The human leukemia cell line, THP-1 : A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. **Experientia**, v. 47, n.1, p. 22-29, 1991.

AVIGAD, G.; DEY, P.M. Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. Estados Unidos: Academic Press, 1997, p. 143-204.

BANDERALI, U.; BELKE, D.; SINGH, A.; JAYANTHAN, A.; GILES, W.R.; NARENDHAN, A. Curcumin blocks Kv11.1 (*erg*) potassium current and slows proliferation in the infant acute monocytic leukemia cell line THP-1. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 1169-1180, 2011.

BARENDSSEN, N.; CHEN, B. Phospholipase C-induced monocytic differentiation in a human monocytic leukemia cell line THP-1. **Leukemia and Lymphoma**, v. 7, n. 4, p. 323-329, 1992.

BERETTA, M.E.; FERNANDES, A.C.; SCHNEIDER, A.A.; RITTER, M.R. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 6, n. 3, p. 189-216, 2008.

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

BIOLOGIA CELULAR INTERATIVA. Ilustração. Disponível em: <<http://biocelinterativa.blogspot.com/2009/04/ciclo-celular.html>>. Acesso em 13/01/2012.

BLAGOJEVIC, P.; RADULOVIC, N.; PALIC, R.; STOJANOVIC, G. Chemical Composition of the essential oils of serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4780–4789, 2006.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 484-489, 1973.

BORA, K.S.; SHARMA, A. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 403–409, 2010.

BORA, K.S.; SHARMA, A. Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. **Pharmaceutical Biology**, in press, 2011.

BOULET, J.C.; WILLIAMS, P.; DOCO, T. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 79–85, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S. Composição polissacarídica: estrutura da parede celular e fibra alimentar. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; WITTIG DE PENNA, E.; MENEZES E.W. (Ed.). **Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnologia y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. São Paulo: Projeto CYTED XI.6, 2001. p. 43-60.

BYARD, R.W. A review of the potential forensic significance of traditional herbal medicines. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, n. 1, 2010.

CANADANOVIC-BRUNET, J.M.; DJILAS, S.M.; CETKOVIC, G.S.; TUMBAS, V.T. Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 2, p. 265-272, 2005.

CANCELLI, R.R.; EVALDT, A.C.P.; BAUERMANN, S.G. Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul -Parte I. **Pesquisas, Botânica**, n. 58, p. 347-374, 2007.

CANER, A.; DOSKAYA, M.; DEGIRMENCI, A.; CAN, H.; BAYKAN, S.; UNER, A.; BASDEMIR, G.; ZEYBER, U.; GURUZ, Y. Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 173–179, 2008.

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. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 52-108.

CHANDRASHEKAR, P.M.; PRASHANTH, K.V.H.; VENKATESH, Y.P. Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructans from aged garlic extract. **Phytochemistry**, v. 72, n. 2-3, p. 255–264, 2011.

CHEN, X.W.; SNEED, K.B.; ZHOU, S.F. Pharmacokinetic profiles of anticancer herbal medicines in humans and the clinical implications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 3190-3210, 2011.

CHEN-DEUTSCH, X.; GARAY, E.; ZHANG, J.; HARRISON, J.S.; STUDZINSKI, G.P. C-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) antagonizes the signaling of differentiation by JNK1 in human myeloid leukemia cells resistant to vitamin D. **Leukemia Research**, v. 33, n. 10, p. 1372–1378, 2009.

CHOQUE-DELGADO, G.T.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; PASTORE, G.M. Immunomodulatory effects of fructans. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1231–1236, 2010.

CIPRIANI, T.R. **Polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) com atividade gastroprotetora**. 95f. Tese (doutorado em ciências) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CLARKE, A. E.; ANDERSON, R. L.; STONE, B. A. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochemistry**, v. 18, n. 4, p. 521-540, 1979.

CLASSEN, B.; THUDE, S.; BLASCHEK, W.; WACK, M.; BODINET, C. Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 9-10, p. 688–694, 2006.

CORSINI, E.; AVOGADRO, A.; GALBIATI, V.; DELL'AGLI, M.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; GERMOLEC, D.R. *In vitro* evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, n. 2, p. 108–116, 2011.

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J.A.; MARRIOTT, H.M.; WHYTE, M.K.B.; DOCKRELL, D.H. The Identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and Monocyte-Derived Macrophages. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, e8668, 2010.

DEIML, T.; HASENER, R.; ZIEGLGANSBERGER, W.; RAMMES, G.; EISENSAMER, B.; RUPPRECHT, R.; HAPFELMEIER, G. Alpha-thujone reduces 5-

HT3 receptor activity by an effect on the agonist-reduced desensitization. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 2, p.192–201, 2004.

DONGFENG, W.; CHENGHONG, W.; JUN, L.; GUIWEN, Z. Components and Activity of Polysaccharides from Coarse Tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 507-510, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EBBELL, B. **The Papyrus Ebers: The Greatest Egyptian Medical Document**. London: Oxford University Press, 1937.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v. 67, n. 3, p. 517-531, 1968.

ELLIS, M.; EGELUND, J.; SCHULTZ, C.J.; BACIC, A. Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface? **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 403–419, 2010.

ENGDAL, S.; KLEPP, O.; NILSEN, O.G. Identification and Exploration of Herb-Drug Combinations Used By Cancer Patients. **Integrative Cancer Therapies**, v. 8, n. 1, p. 29-36, 2009.

FARMER, C. **Mugwort**. 2003. Fotografia. Disponível em: <<http://www.plant-identification.co.uk/skye/compositae/artemisia-vulgaris.htm>> Acesso em: 24/10/2010.

FERREIRA, J.F.; LUTHRIA, D.L.; SASAKI, T.; HEYERICK, A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3135-70, 2010.

FINCHER, G.B.; STONE, B.A.; CLARKE, A.E. Arabinogalactan-Proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, n. 1, p. 47-70, 1983.

FONTANA, J.D.; BARON, M.; DINIZ, A.C.P.; FRANCO, V.C. Microbial Inulinase Secretion Using Chemically Modified Inulins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45/46, n. 1, p. 257-268, 1994.

FOSTER, S.; DUKE, J.A. **A field guide to medicinal plants and herbs: of eastern and central North America**. 2 ed. Wilmington: houghton mifflin Company trade & Reference Division, 1999. p. 247-249.

FUNG, H.; SHEPHERD, J.D.; NAIMAN, S.C.; BARNETT, M.J.; REECE, D.E.; HORSMAN, D.E.; NANTEL, S.H.; SUTHERLAND, H.J.; SPINELLI, J.J.; KLINGEMANN, H.-G.; PHILLIPS, G.L. Acute monocytic leukemia: a single Institution Experience. **Leukemia and Lymphoma**, v. 19, n. 3-4, p. 259-265, 1995.

GANE, A. M.; CRAIK, D.; MUNRO, S. L. A.; HOWLETT, G. J.; CLARKE, A. E.; BACIC, A. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana alata*. **Carbohydrate Research**, v. 277, n. 1, p. 67–85, 1995.

GARDENS AND PLANTS.COM. **Artemisia absinthium**. 2012. Fotografia.  
Disponível em: <<http://www.gardensandplants.com/images/plants/Artemisia%20absinthium.jpg>>. Acesso em 30/01/2012.

GASPAR, Y.; JOHNSON, K.L.; MCKENNA, J.A.; BACIC, A.; SCHULTZ, C.J. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1-2, p. 161–176, 2001.

GEBRE-HIWOT, A.; TADESSE, G.; CROFT, S.;L.; FROMMEL, D. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. **Acta Tropica**, v. 51, n. 3-4, p. 237-245, 1992.

GILANI, A.H.; YAEESH, S.; JAMAL, Q.; GHAYUR, M.N. Hepatoprotective Activity of Aqueous–Methanol Extract of *Artemisia vulgaris*. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 2, p. 170–172, 2005.

GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Preparation of soy hull pectin. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 461-467, 1999.

GÖLLNER, E.M.; ICHINOSE, H.; KANEKO, S.; BLASCHEK, W.; CLASSEN, B. An arabinogalactan-protein from whole grain of *Avena sativa* L. belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 53, n. 2, p. 244-249, 2011.

GOVINDARAJ, S.; KUMARI, B.D.R.; CIONI, P.L.; FLAMINI, G. Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 176–183, 2008.

GRZYBOWSKI, A. **Hidrólise parcial cítrica ou fosfórica de inulina para a obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS)**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

HAIDER, F.; DWIVEDI, P. D.; NAQVI, A. A.; BAGCHI, G. D. Essential oil composition of *Artemisia vulgaris* harvested at different growth periods under Indo-Gangetic plain conditions. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 6, p. 376-378, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANKS, J. H.; WALLACE, R. E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 71, n. 2, p. 196, 1949.

HARRIS, P.J.; HENRY, R.J.; BLAKENEY, A.B.; STONE, B.A. An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 127, n. 1, p. 59-73, 1984.

HASKÅ, L.; NYMAN, M.; ANDERSSON, R. Distribution and characterisation of fructan in wheat milling fractions. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 3, p. 768–774, 2008.

HASSAN, N.F.; KAMANI, N.; MESZAROS, M.M.; DOUGLAS, S.D. Induction of multinucleated giant cell formation from human blood-derived monocytes by phorbol myristate acetate in *in vitro* culture. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 7, p. 2179-2184, 1989.

HAYAT, M.Q.; ASHRAF, M.; KHAN, M.A.; MAHMOOD, T.; AHMAD, M.; JABEEN, S. Phylogeny of *Artemisia* L.: Recent developments. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 11, p. 2423-2428, 2009.

HENDRY, G. A. F. Evolutionary origins and natural fractions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New Phytologist**, v. 123, n. 1, p. 3-14, 1993.

HILLESTAD, A.; WOLD, J.K.; ENGEN, T. Water-soluble glycoproteins from *Cannabis sativa* (Thailand). **Phytochemistry**, v. 16, n. 12, p. 1953-1956, 1977.

HINCHA, D.K.; LIVINGSTON, D.P.; PREMAKUMAR, R.; ZUTHER, E.; OBEL, N.; CACELA, C.; HEYER, A.G. Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 6, p. 1611–1619, 2007.

HOFFMANN, B.; HERRMANN, K. Flavonol glycosides of mugwort (*Artemisia vulgaris*), tarragon (*Artemisia dranunculus*) and absinthe (*Artemisia absinthium*). **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 174, p. 211–215, 1982.

HOLD, K.M.; SIRISOMA, N.S.; IKEDA, T.; NARAHASHI, T.; CASIDA, J.E.  $\alpha$ -Thujone (the active component of absinthe):  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, n. 8, p. 3826–3831, 2000.

HYUN, J.-W.; CHEON, G.-J.; KIM, H.-S.; LEE, Y.-S.; CHOI, E.-Y.; YOON, B.-H.; KIM, J.-S.; CHUNG, M.-H. Radiation sensitivity depends on OGG1 activity status in human leukemia cell lines. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 3, p. 212–220, 2002.

INCA. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=344](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344)>. Acesso em: 29/01/2012.

JARVIS, M. C. A survey of pectin content of nonlignified monocot cell walls. **Plant Physiology**, v. 88, n. 2, p. 309-314, 1988.

JERMYN, M.A. A new method for determining ketohexoses in the presence of aldohexoses. **Nature**, v. 177, p. 38-39, 1956.

JUDŽENTIENĖ, A.; BUZELYTĖ, J. Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from north Lithuania. **Chemija**, v. 17, n. 1, p. 12–15, 2006.

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

KARÁCSONYI, S.; PATOPRSTÝ, V.; KUBAČKOVÁ, M. Structural study on arabinogalactan-proteins from *Picea abies* L. Karst. **Carbohydrate Research**, v. 307, n. 3-4, p. 271-279, 1998.

KENNEDY, J.F.; STEVENSON, D. L.; WHITE, C. A.; LOMBARD, A.; BUFFA, M. Analysis of the oligosaccharides from the roots of *Arnica montana* L., *Artemisia absinthium* L., and *Artemisia dracuncula* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 9, n. 4, p. 277-285, 1988.

KHAN, A.; GILANI, A.H. Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 480–486, 2009.

KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E. de.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, n. 2, p. 143–161, 2002.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A.; CAKIR, A.; ALA, A.; YILDIRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracuncululus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracuncululus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9452–9458, 2005.

KREBS, S.; OMER, T.N.; OMER, B. Wormwood (*Artemisia absinthium*) suppresses tumour necrosis factor alpha and accelerates healing in patients with Crohn's disease – A controlled clinical trial. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 305–309, 2010.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of Cells Cultured on 96-Well Plates. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 1, p. 16-19, 1989.

KVERNHEIM, A.L. Methylation analysis of polysaccharides with butyllithium in dimethyl sulfoxide. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 41B, p. 150-152, 1987.

LACHENMEIER, D.W.; EMMERT, J.; KUBALLA, T.; SARTOR, G. Thujone-cause of absinthism? **Forensic Science International**, v. 158, p. 1-8, 2006.

LACHENMEIER, D.W. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) – A curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 224-227, 2010.

LAWSON, L.D.; WANG, Z.Y.J. Changes in the organosulfur compounds released from garlic during aging in water, dilute ethanol, or dilute acetic acid. **Journal of Toxicology**, v. 14, p. 214, 1995.

LEE, J.-B.; FUKAI, T.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T. Characterization of fructan from Chikuyo-Sekko-To, a Kampo prescription, and its antiherpetic activity *in vitro* and *in vivo*. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 2, p. 408–412, 2011.

LEONARD, R.; PETERSEN, B.O.; HIMLY, M.; KAAR, W.; WOPFNER, N.; KOLARICH, D.; REE, R.V.; EBNER, C.; DUUS, J.; FERREIRA, F.; ALTMANN, F. Two novel types of O-glycans on the mugwort pollen allergen Art v 1 and their role in antibody binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7932–7940, 2005.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.C.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, n. 2, p. 101–114, 2006.

LIM, H-K.; KANG, H-K.; YOO, E-S.; KIM, B-J.; KIM, Y-W.; CHO, M.; LEE, J-H.; LEE, Y-S.; CHUNG, M-H.; HYUNA, J.W. Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G2/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. **Life Sciences**, v. 72, p. 1389–1399, 2003.

LIMA, C.F.; CARVALHO, F.; FERNANDES, E.; BASTOS, M.L.; SANTOS-GOMES, P.C.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 4, p. 457–465, 2004.

LIVINGSTON, D.P.; HINCHA, D.K.; HEYER, A.G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 13, p. 2007–2023, 2009.

LOHRUM, M.; STUNNENBERG, H.G.; LOGIE, C. The new frontier in cancer research: Deciphering cancer epigenetics. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 7-8, p. 1450–1461, 2007.

LOO, D.T.; RILLEMA, J.R. Measurement of cell death. In: MATHER, J.P.; BARNES, D. (Ed.). **Methods in Cell Biology**, v. 57, Academic Press, 1998. p. 251-264.

LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KOLODZIEJCZYK, P.P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732–1738, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. p. 11-25; 118-121.

LOUIS, A.; PETEREIT, F.; LECHTENBERG, M.; DETERS, A.; HENSEL, A. Phytochemical characterization of *Rhododendron ferrugineum* and *in vitro* assessment of an aqueous extract on cell toxicity. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1550–1557, 2010.

MABEY, R.; MCINTYRE, M.; MICHAEL, P.; DUFF, G.; STEVENS, J. **The complete new herbal**. London: Gaia Books Ltd, 1988. p. 41-44.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143-148, 2002.

MARTÍN, L.; MAINAR, A.M.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; BURILLO, J.; URIETA, J.S. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 1, p. 64–71, 2011.

MATHERS, N. J.; XU, Z.; BLUMFIELD, T. J.; BERNERS-PRICE, S. J.; SAFFIGNA P. G. Composition and quality of harvest residues and soil organic matter under windrow residue management in young hoop pine plantations as revealed by solidstate <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. **Forest Ecology and Management**, v. 175, n. 1-3, p. 467-488, 2003.

MAURER, J.B.B.; BACIC, A.; PEREIRA-NETTO, A.B.; DONATTI, L.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; PETTOLINO, F.A. Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11-12, p. 1400–1409, 2010.

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

McINNES, A.; RENNICK, D.M. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 598-611, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares (PMNPC). Resumo Executivo, Brasília, fevereiro, 2005. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ResumoExecutivoMedNatPratCompl1402052.pdf>>. Acesso em 25/10/2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas\\_medicinais.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas_medicinais.pdf)>. Acesso em 26/10/2010.

MOASSER, M.M. Neoplasia. In: McPHEE, S.J.; GANONG, W.F. **Fisiopatologia da doença. Uma introdução à medicina clínica**. 5. ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p. 75-97.

MULLER, G.; ROSNER, H.; ROHRMANN, B.; ERLER, W.; GESCHWEND, G.; GRAFE, U.; BURKERT, B.; MOLLER, U.; DILLER, R.; SACHSE, K.; KOHLER, H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. **Toxicology**, v. 184, n. 1, p. 69-82, 2003.

NAVARINI, L.; GILLI, R.; GOMBAC, V.; ABATANGELO, A.; BOSCO, M.; TOFFANIN, R. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 1, p. 71–78, 1999.

NAWAB, A.; YUNUS, M.; MAHDI, A.A.; GUPTA, S. Evaluation of anticancer properties of medicinal plants from the Indian sub-continent. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 21-29, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS. (2008). **Traditional Medicine**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>> Acesso em: 05/01/2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS (2012). Cancer mortality and morbidity. Disponível em: <[http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/cancer/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html)>. Acesso em: 10/01/2012.

ORHAN, I.E.; BELHATTAB, R.; ŞENOL, F.S.; GÜLPINAR, A.R.; HOŞBAŞ, S.; KARTAL, M. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. glandulosum and essential oil analysis of two *Artemisia* species. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 566–571, 2010.

PANIZZA, S. Fitoterapia. In: GONSALVES, P. E. (Org.). **Medicinas alternativas: Os tratamentos não-convencionais**. 2ª ed. São Paulo: Ibrasa, 1996. p. 81-131.

PARK, S-D.; LAI, Y-S.; KIM, C-H. Immunopotentiating and antitumor activities of the purified polysaccharides from *Phellodendron chinese* SCHNEID. **Life Sciences**, v. 75, n. 22, p. 2621–2632, 2004.

PELLERIN, P.; WATERS, E.; BRILLOUET, J.-M. Characterization of two arabinogalactan-proteins from red wine. **Carbohydrate Polymers**, v. 22, n. 3, p. 187-192, 1993.

PIRES, J.M.; MENDES, F.R.; NEGRI, G.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; CARLINI, E.A. Antinociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 2, p. 212–219, 2009.

POLLOCK, C. J. Patterns of turnover of fructans in leaves of *Dactylis glomerata* L. **New Phytologist**, v. 90, n. 4, p. 645-650, 1982.

POPOV, S.V.; POPOVA, G.YU.; OVODOVA, R.G.; OVODOV, YU.S. Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 281– 287, 2005.

POPOVICH, D.G.; KITTS, D.D. Structure–function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 406, n. 1, p. 1–8, 2002.

PORTAL DA SAÚDE. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>>. Acesso em 25/1/2011.

QIN, X.; YAMAUCHI, R. AIZAWA, K.; INAKUMA, T.; KATOA, K. Structural features of arabinogalactan–proteins from the fruit of *Lycium chinense* Mill. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 1, p. 79–85, 2001.

REDGWELL, R.J.; CURTI, D.; WANG, J.; DOBRUCHOWSKA, J.M.; GERWIG, G.J.; KAMERLING, J.P.; BUCHELI, P. Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 2. Characterisation of arabinogalactan- proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1075–1083, 2011.

REID, J.S, G. Carbohydrate Metabolism: Structural Carbohydrate. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. Estados Unidos: Academic Press, 1997, p. 205-236.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803–810, 1998.

REITER, W.D. *Arabidopsis thaliana* as a model system to study synthesis, structure, and function of the plant cell wall. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 167-176, 1998.

RETHY, B.; CSUPOR-LÖFFLER, B.; ZUPKÓ, I.; HAJDÚ, Z.; MÁTHÉ, I.; HOHMANN, J.; RÉDEI, T.; FALKAY, G. Antiproliferative activity of hungarian Asteraceae Species against human cancer cell lines. Part I. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 12, p. 1200–1208, 2007.

RITSEMA, T.; SMEEKENS, S. Fructans: beneficial for plants and humans. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 223–230, 2003.

SAMUELSEN, A.B.; PAULSEN, B.S.; WOLD, J.K.; KNUTSEN, S.H.; YAMADA, H. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, n. 3-4, p. 145-153, 1998.

SCHEPETKIN, A. I.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; SCHAAFSMA, G.; VAN DEN HEUVEL, E.G.; SCHREZENMEIR, J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, suplement. 2, p. 459-464, 2001.

SCHWARTING, R.; KOCHER, W.D.; MCKENZIE, S.; ALOMARI, M. Hematopatologia. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Patologia. Bases clínicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 1039-1146.

SEIFERT, G.J.; ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 137-161, 2007.

SHIN, J.-Y.; SONG, J.-Y.; YUN, Y.-S.; YANG, H.-O.; RHEE, D.-K.; PYO, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 469–482, 2002.

SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, v. 5, n. 1, p. 9-23, 1993.

SIMAS-TOSIN, F.F. **Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de *Prunus persica*: caracterização estrutural e análises reológicas**. 145f. Tese (doutorado em ciências-bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SIMS, I.M.; CAIRNS, A.J.; FURNEAUX, R.H. Structure of fructans from excised leaves of New Zealand flax. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 661–668, 2001.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIVEEN, K.S.; KUTTAN, G. Augmentation of humoral and cell mediated immune responses by Thujone. **International Immunopharmacology**, in press, 2011.

SMIDERLE, F.R.; RUTHES, A.C.; VAN ARKEL, J.; CHANPUT, W.; IACOMINI, M.; WICHERS, H.J.; VAN GRIENSVEN, L. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 58, p. 11-20, 2011.

STEINHORN, G.; SIMS, I.M.; CARNACHAN, S.M.; CARR, A.J.; SCHLOTHAUER, R. Isolation and characterisation of arabinogalactan-proteins from New Zealand kanuka honey. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 949–956, 2011.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 9, June 2008. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 15/01/2012.

STONE, B. A; ANDERSON, M. A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, n. 2, p. 115-129, 1985.

SUJATHA, G.; KUMARI, B.D.R. Micropropagation, encapsulation and growth of *Artemisia vulgaris* node explants for germplasm preservation. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 1, p. 93–100, 2008.

TAN, R.X.; ZHENG, W.F.; TANG, H.Q. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p. 295-302, 1998.

TANG, S.Y.; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 1, p. 1-5, 2010.

TAPER, H.S.; ROBERFROID, M. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1488-1491, 1999.

TARIQ, K.A.; CHISHTI, M.Z.; AHMAD, F.; SHAWL, A.S. Antihelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 83–88, 2009.

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, n. 8, p. 1383–1389, 1972.

TEGTMEIER, M.; HARNISCHFEGER, G. Methods for the reduction of thujone content in pharmaceutical preparations of *Artemisia*, *Salvia* and *Thuja*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 40, n. 5, p. 337–340, 1994.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A. Mining the essential oils of the Anthemideae. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 12, p. 706-720, 2004.

THUDE, S.; CLASSEN, B. High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1026-1032, 2005.

THUDE, S.; CLASSEN, B.; BLASCHEK, W.; BARZ, D.; THUDE, H. Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 425–427, 2006.

TIN, A.S.; SUNDAR, S.N.; TRAN, K.Q.; PARK, A.H.; POINDEXTER, K.M.; FIRESTONE, G.L. Antiproliferative effects of artemisinin on human breast cancer cells requires the downregulated expression of the E2F1 transcription factor and loss of E2F1-target cell cycle genes. **Anti-Cancer Drugs**, in press, 2011.

TRAORE, K.; TRUSH, M.A.; GEORGE JR, M.; SPANNHAKE, E.W.; ANDERSON, W.; ASSEFFA, A. Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. **Leukemia Research**, v. 29, n. 8, p. 863–879, 2005.

TSUCHIYA, S.; YAMABE, M.; YAMAGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KONNO, T.; TADA, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **International Journal of Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-176, 1980.

USDA-ARS-NGRL (2004) Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical databases. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/duke/chem-activities.html>>. Acesso em 10/01/2012.

VALLURU, R.; VAN DEN ENDE, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 11, p. 2905–2916, 2008.

VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. Fructans in dicotyledonous plants: occurrence and metabolism. In: Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S, eds. **Recent advances in fructo-oligosaccharides research**. Trivandrum, India: Research Signpost, 2007. p. 1–14.

VIDASUL SEMENTES. **Losna/ absinto**. 2011. Fotografia. Disponível em: <<http://www.vidasul.com/produto.php?id=179>> Acesso em 23/02/2011.

VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**, v. 120, n. 2, p. 351–359, 1999.

VRCHOVSKÁ, V.; SPILKOVÁ, J.; VALENTÃO, P.; SOUSA, C.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M. Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1396–1403, 2007.

WALCH, S.G.; KUBALLA, T.; STÜHLINGER, W.; LACHENMEIER, D.W. Determination of the biologically active flavor substances thujone and camphor in foods and medicines containing sage (*Salvia officinalis* L.) **Chemistry Central Journal**, v. 5, p. 44-54, 2011.

WANG, X.S.; ZHENG, Y.; ZUO, J.P.; FANG, J.N. Structural features of an immunoactive acidic arabinogalactan from *Centella asiatica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 3, p. 281–288, 2005.

WANG, X.; GOCEK, E.; LIU, C.G.; STUDZINSKI, G.P. MicroRNAs181 regulate the expression of p27Kip1 in human myeloid leukemia cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Cell Cycle**, v. 8, n. 5, p. 736-741, 2009.

WHITE, E.V.; RAO, P.S. Constitution of the polysaccharide from tamarind seed. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, n. 11, p. 2617-2619, 1953.

WILLATS, W.G.T.; STEELE-KING, C.G.; McCARTNEY, L.; ORFILA, C.; MARCUS, S.E.; KNOX, J.P. Making and using antibody probes to study plant cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1-2, p. 27-36, 2000.

WILLIAMS, G.H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 352-364, 2012.

WISE, C. S.; DIMLER, R. J.; DAVIS, H. A.; RIST, C. E. Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparations. **Analytical Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 33-36, 1955.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydrate. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65, 1963b.

WU, X.M.; GAO, X.M.; TSIM, K.W.K.; TU, P.F. An arabinogalactan isolated from the stems of *Cistanche deserticola* induces the proliferation of cultured lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 5, p. 278-282, 2005.

WU, S.-C.; LEE, B.-H. Buckwheat polysaccharide exerts antiproliferative effects in THP-1 human leukemia cells by inducing differentiation. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 1-2, p. 26-33, 2011.

XIE, G.; SCHEPETKIN, Y.A.; SIEMSEN, D.W.; KIRPOTINA, L.N.; WILEY, J.A.; QUINN, M.T. Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartita*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1359-1371, 2008.

XU, H.; HE, Y.; YANG, X.; LIANG, L.; ZHAN, Z.; YE, Y.; YANG, X.; LIAN, F.; SUN, L. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF- $\alpha$ -induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF- $\kappa$ B and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Rheumatology**, v. 46, n. 6, p. 920-926, 2007.

XU, R.; YE, H.; SUN, Y.; TU, Y.; ZENG, X. Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). **Food and Chemical Toxicology**, in press, 2011.

YANG, L.; ZHANG, L.M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 349–361, 2009.

ZANDHOOGTE. Fotografia. Disponível em: <<http://www.zandhoogte.nl/plantenlijst/index.php?act=view&id=56>> Acesso em 24/10/2010.

ZHAO, Q.-C.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Anti-complementary neutral polysaccharides from leaves of *Artemisia princeps*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 1, p. 73-77, 1994.

ZHAO, Y.; JIANG, W.; LI, B.; YAO, Q.; DONG, J.; CEN, Y.; PAN, X.; LI, J.; ZHENG, J.; PANG, X.; ZHOU, H. Artesunate enhances radiosensitivity of human non-small cell lung cancer A549 cells via increasing NO production to induce cell cycle arrest at G2/M phase. **International Immunopharmacology**, in press, 2011.

ZIPPEL, J.; WELLS, T.; HENSEL, A. Arabinogalactan protein from *Jatropha curcas* L. seeds as TGF $\beta$ 1-mediated inducer of keratinocyte in vitro differentiation and stimulation of GM-CSF, HGF, KGF and in organotypic skin equivalents. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 772–778, 2010.