

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO FELIPE PEREIRA CHAVES

POLISSACARÍDEOS DE INFUSÃO DE CAMOMILA (*Chamomilla recutita* [L.]
Rauschert): CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES
ANTINOCICEPTIVA E ANTIÚLCERA GÁSTRICA.

CURITIBA

2015

PEDRO FELIPE PEREIRA CHAVES

POLISSACARÍDEOS DE INFUSÃO DE CAMOMILA (*Chamomilla recutita* [L.]
Rauschert): CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES
ANTINOCICEPTIVA E ANTIÚLCERA GÁSTRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dr.^a Lucimara M. C. Cordeiro

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Chaves, Pedro Felipe Pereira

Polissacarídeos de infusão de Camomila (*Chamomilla recutita* [L.]
Rauschert): caracterização estrutural e atividades antinociceptiva e
antiúlcera gástrica. / Pedro Felipe Pereira Chaves. – Curitiba, 2015.
84f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lucimara M. C. Cordeiro

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

1. Camomila. 2. Matricaria. 3. Polissacarídeos. I. Título II. Cordeiro,
Lucimara Mach. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

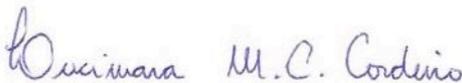
CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

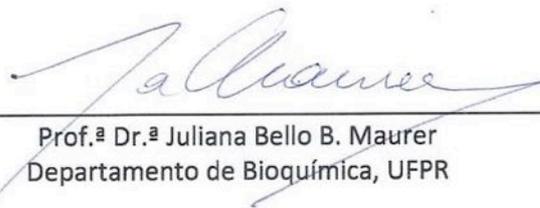
PEDRO FELIPE PEREIRA CHAVES

Polissacarídeos de infusão de camomila (*Chamomilla recutita* [L.]
Rauschert): caracterização estrutural e atividades antinociceptiva e antiúlcera
gástrica.

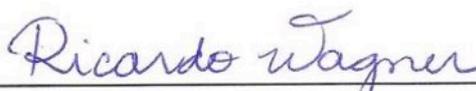
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.^a Dr.^a Lucimara M. C. Cordeiro - Orientadora
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.^a Dr.^a Juliana Bello B. Maurer
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Ricardo Wagner
Depto. de Análises Clínicas, UFPR

Curitiba, 25 de agosto de 2015.

Dedico esta dissertação para todos aqueles que não medem esforços no desenvolvimento da ciência em nosso país, principalmente aos professores pesquisadores.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por fazer as coisas tão perfeitas em sua complexidade.

À minha mãe Maria Ledy Filipin por sempre estar ao meu lado nunca me deixando desanimar, por ser meu exemplo de vida.

À minha orientadora, Prof. Dra. Lucimara Cordeiro pela oportunidade, dedicação, tempo e confiança depositados em mim.

À industria Chamel Produtos Naturais, pela doação do material de estudo.

Ao grupo de química de carboidratos, principalmente ao laboratório 250 (MSc. Carolina Leivas, MSc. Helyn Barddal, MSc. Ana Flávia Oliveira, MSc. Yony Róman) por toda ajuda, conversas e amizade durante estes dois anos.

Aos colegas dos outros grupos de pesquisa, pelos empréstimos, ajudas e conversas.

Aos professores, técnicos e alunos responsáveis pelas análises, principalmente ao Dr. Arquimedes Santana, Prof. Dr. Guilherme Sasaki, Rosane Tambosi e Elisangela Assunção, pela atenção e dúvidas sanadas.

Ao Dr. Lauro Souza, pelas análises e ajuda com os dados.

À Prof. Dra. Maria Fernanda Werner e Dra. Cristiane Baggio do Departamento de Farmacologia, pela colaboração com os ensaios biológicos e por toda atenção e dedicação dada a este trabalho.

Aos alunos de iniciação científica do Departamento de Farmacologia Mariane Mion e Jorge Dallazen, por toda ajuda e dedicação com os ensaios biológicos.

À Prof. Dra. Silvia Cadena, por toda ajuda e dedicação para com algumas questões burocráticas no decorrer do curso.

Aos professores Dr. Thales Cipriani e Dr. Marcello Iacomini pela atenção e tempo em sanar algumas dúvidas.

À Prof. Dra. Juliana Maurer, pelas correções do projeto e relatório, pelas dicas e por aceitar participar da banca examinadora desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Wagner por aceitar participar da banca examinadora desta dissertação.

Às agências financiadoras, Fundação Araucária, Capes e CNPq, pela bolsa e todo auxílio financeiro.

À todos que de alguma maneira ajudaram no andamento desta pesquisa. Obrigado!

“Cada adversidade, cada fracasso, cada dor de cabeça
carrega consigo a semente de um benefício igual ou maior.”

Napoleon Hill

RESUMO

Chamomilla recutita é comumente utilizada na fitoterapia e está incluída nas farmacopeias de quase todos os países. Esta espécie possui importantes propriedades farmacológicas, como por exemplo ação anti-inflamatória e sedativa. Alguns destes efeitos se devem à presença dos metabólitos secundários, mas não é sabido se outras moléculas, tais como polissacarídeos, trabalham em conjunto para estes efeitos. A caracterização estrutural destes polímeros é de suma importância para elucidar a relação entre as estruturas químicas com suas atividades biológicas. Poucos são os estudos realizados sobre a estrutura química e atividade biológica dos polissacarídeos da camomila e nenhum deles abordou a caracterização química fina destas moléculas. Para aprimorar o conhecimento científico da espécie e corroborar a eficácia dos usos populares, o presente estudo objetivou-se na elucidação química fina e avaliação das atividades antinociceptiva e gastroprotetora dos polissacarídeos presentes no infuso dos capítulos florais da camomila. Os capítulos florais secos foram submetidos a infusão (chá), que após concentração e precipitação com etanol (3x vol.) gerou um fracção bruta de polissacarídeos com rendimento de 3,2% (MRW) e uma fração sobrenadante etanólico com rendimento de 20,2% (MRW-ET). A partir da fração bruta foram purificadas e caracterizadas uma frutana do tipo inulina (SCETE-10E), uma homogalacturonana altamente metil esterificada e acetilada (DE = 87%, e DA = 19%) (SMRW-100R), uma 4-*O*-metil-glucuronoxilana (CTSN-100R) e uma arabinogalactana do tipo II (CCCEDE-EDEAE). A partir do sobrenadante etanólico foi investigado a presença de frutanas de baixa massa molar e realizada a verificação do grau de polimerização (DP) destas moléculas, que consistiu em polímeros de 2 a 11 unidades de β -D-Fruçf-(2→1). As amostras SCETE-10E, SMRW-100R e CTSN-100R foram submetidas a avaliação da atividade antinociceptiva *in vivo*, sendo que as frações SCETE-10E e SMRW-100R não mostraram diminuição na nocicepção e a fração CTSN-100R mostrou diminuição na nocicepção da fase aguda (Fase I) e inflamatória (Fase II). Devido a sintomas como sonolência e pelos ouriçados, na avaliação antinociceptiva de CTSN-100R, foi realizado o teste de campo aberto para verificar se o polissacarídeo poderia estar afetando os sistema locomotor dos animais. A partir deste teste foi verificada uma diminuição na locomoção dos animais e este resultado indica que a fração CTSN-100R poder ter obtido um falso positivo na avaliação da atividade antinociceptiva, e que a real atividade pode ser a sedativa. A fração MRW foi submetida a avaliação da atividade antiúlceras gástrica *in vivo* e mostrou diminuição na área das lesões causadas por etanol no estômago dos animais, indicando que a fração bruta de polissacarídeos apresenta atividade antiúlceras gástrica.

Palavras chave: Camomila. *Matricaria recutita*. Polissacarídeos. Atividade antinociceptiva. Atividade antiúlceras gástrica.

ABSTRACT

Chamomilla recutita is one of most commonly used species in herbal medicine and is included in the pharmacopoeia of almost all countries. This species has valuable pharmacological properties such as anti-inflammatory and sedative effect. Some of these effects are attributed to the presence of secondary metabolites, but it is not known whether other molecules such as polysaccharides, are working together for this purpose. The structural characterization of these polymers is of paramount importance to elucidate the relationship between chemical structure with their biological activities. There are few studies on the chemical structure and biological activity of chamomile polysaccharides and neither fulfilled the fine chemical characterization of these molecules. To improve scientific knowledge of the species and support the effectiveness of popular uses, this study aimed to elucidate the fine chemical structure and evaluate an antinociceptive and gastroprotective activity of the polysaccharides present in the infusion of chamomile flower chapters. The dried flower chapters were subjected to infusion (tea) which after concentration and precipitation with ethanol (3x vol.) generated a crude polysaccharide fraction in a yield of 3.2% (MRW) and a fraction ethanolic supernatant in a yield of 20.2% (MRW-ET). From the crude fraction were purified and characterized a inulin type fructan (SCETE-10E), a highly methyl esterified and acetylated homogalacturonan (DE = 87% and DA = 19%) (SMRW-100R) a 4-*O*-methyl-glucuronoxylan (CTSN-100R) and a type II arabinogalactan (CCCEDE-EDEAE). From the ethanolic supernatant was noticed the presence of low molar mass fructan and performed the verification of the degree of polymerization (DP) of these molecules, the polymers consisted of 2 to 11 units of β -D-Frucf-(2 \rightarrow 1). The SCETE-10E, SMRW-100R and 100R-CTSN samples were subjected to evaluation of *in vivo* antinociceptive activity, where SCETE-10E and SMRW-100R fractions showed no decrease in nociceptive perception and while CTSN-100R fraction showed decreased of nociception in acute (Phase I) and inflammatory (Phase II) phases. Due to symptoms such as drowsiness and piloerection, in CTSN-100R antinociceptive evaluation, open field test was performed to verify if the polysaccharide could be affecting the locomotor system of animals. From this test it was observed a decrease in locomotion of the animals and this result indicates that CTSN-100R fraction may has produced a false positive result of the antinociceptive activity and the real activity can be sedating. MRW fraction was subjected to evaluation of gastric anti-ulcer activity *in vivo* and showed a decrease in the area of the lesions caused by ethanol in the stomach of the animals, indicating that the crude fraction of polysaccharides has gastric anti-ulcer activity.

Keywords: Chamomile. *Matricaria recutita*. Polysaccharides. Antinociceptive activity. Gastric antiulcer activity.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. FOTO DE UMA PLANTAÇÃO DE CAMOMILA, LOCALIZADA EM CAMPO LARGO - PR E EM DETALHE UM CAPÍTULO FLORAL..... 19
- FIGURA 2. ESQUEMA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA ADAPTADO DE BRETT E WALDRON (1996). 23
- FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS PECTINAS, ADAPTADO DE WILLATS E COLABORADORES (2006). 26
- FIGURA 4. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA INFUSÃO DOS CAPÍTULOS FLORAIS DA CAMOMILA..... 35
- FIGURA 5. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DA FRAÇÃO SMRW EM D_2O , A $70\text{ }^\circ\text{C}$, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM. 48
- FIGURA 6. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES SMRW, SMRW-100R e SMRW100E, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID)..... 48
- FIGURA 7. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES SMRW-100R (A) E SMRW-100E (B) EM D_2O , A $70\text{ }^\circ\text{C}$, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM..... 49
- FIGURA 8. REGIÃO DE CAMPO BAIXO DO ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO SMRW-100R. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE METIL-ESTERIFICAÇÃO (A) E ACETILAÇÃO (B)..... 50
- FIGURA 9. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DA FRAÇÃO SCETE-10E EM D_2O , A $70\text{ }^\circ\text{C}$, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM. 52
- FIGURA 10. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO SCETE-10E, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID). 52
- FIGURA 11. TLC DA AMOSTRA MRW-ET (A) E DOS PADRÕES GLUCOSE (G), SACAROSE (S), FRUTOSE (F) E FRAÇÃO CONTENDO FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DAS RAIZES DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*) (B). 53
- FIGURA 12. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA FRAÇÃO MRW-ET EM ESI-MS. PERFIL TOTAL (A) e ZOOM DE 10x NA REGIÃO DE 1300 A 2000 m/z (B). 54
- FIGURA 13. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES SCE-30R (A), SCETE-PF (B) E SCETE-SF (C) EM D_2O , A $70\text{ }^\circ\text{C}$, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM..... 56

| | |
|---|----|
| FIGURA 14. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DA FRAÇÃO CTSF-EN EM D_2O , A 50 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM. | 57 |
| FIGURA 15. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO CTSF-EN, CTSN-100R e CCCEN-10E UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID)..... | 57 |
| FIGURA 16. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES CTSN-100R (A) E CCCEN-10E (B) EM D_2O , A 50 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM. | 59 |
| FIGURA 17. ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO CTSN-100R EM D_2O , A 50 °C COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM. | 59 |
| FIGURA 18. FIGURA 18. ESPECTRO DE HSQC/DEPT DA FRAÇÃO CCCED-EDEAE EM D_2O , A 50 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM. OS SINAIS EM AZUL INVERTERAM NESTE EXPERIMENTO.. | 63 |
| FIGURA 19. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO SMRW-100R NA FASE NEUROGÊNICA (A) E FASE INFLAMATÓRIA (B) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS..... | 65 |
| FIGURA 20. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO SCETE-10E NA FASE NEUROGÊNICA (A) E FASE INFLAMATÓRIA (B) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS..... | 65 |
| FIGURA 21. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO CTSN-100R NA FASE NEUROGÊNICA (A) E FASE INFLAMATÓRIA (B) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS..... | 66 |
| FIGURA 22. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO CTSN-100R NA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMUNDONGOS..... | 66 |
| FIGURA 23. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DA FRAÇÃO MRW (3, 10 E 30 mg/kg) CONTRA LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS (C: CONTROLE, ÁGUA 0,1 mL/100 g; O: OMEPRAZOL 40 mg/kg). | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES..... | 47 |
| TABELA 2 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C (δ) EXPRESSOS EM PPM DA 4-O-METIL-GLUCURONOXILANA PRESENTE NA FRAÇÃO CTSN-100R..... | 60 |
| TABELA 3 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA ARABINO GALACTANA DO TIPO II PRESENTE NA FRAÇÃO CCCEDE-EDEAE..... | 62 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| QUADRO 1 - DIVISÃO TAXÔNOMICA DA CAMOMILA SEGUNDO CRONQUIST (1988)..... | 19 |
|--|----|

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| ^1H -RMN | - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| ^{13}C -RMN | - Ressonância magnética nuclear de carbono 13 |
| δ | - Deslocamento químico |
| Ara | - Arabinose |
| COSY | - Espectroscopia de correlação entre hidrogênios |
| D ₂ O | - Óxido de deutério |
| DA | - Grau de acetilação |
| DE | - Grau de esterificação |
| DEPT | - Intensificação sem distorção por transferência de polarização |
| DP | - Grau de polimerização |
| ESI-MS | - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray |
| Fruc | - Frutose |
| <i>f</i> | - Furanosídico |
| Gal | - Galactose |
| GalA | - Ácido galacturônico |
| GC-MS | - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| Glc | - Glucose |
| GlcA | - Ácido Glucurônico |
| HPSEC | - Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência |
| HSQC | - Espectroscopia de correlação heteronuclear <i>Single-Quantum</i> |
| i.p. | - Intraperitoneal |
| <i>m/z</i> | - Relação massa-carga |
| <i>p</i> | - Piranosídico |
| P.A. | - Para análise |
| ppm | - Partes por milhão |
| Rha | - Ramnose |
| TLC | - Cromatografia de camada delgada |
| TOCSY | - Espectroscopia de correlação total entre hidrogênios |
| Xyl | - Xilose |

FRAÇÕES

| | |
|--------------|---|
| MRW | - Bruta de polissacarídeos |
| MRW-ET | - Sobrenadante etanólico |
| SMRW | - Solúvel do congelamento e descongelamento |
| SMRW-100R | - Retida da ultrafiltração em membrana de 100kDa, a partir da fração SMRW |
| SMRW-100E | - Eluída da ultrafiltração em membrana de 100kDa, a partir da fração SMRW |
| SCE-30R | - Retida da ultrafiltração em membrana de 30kDa, a partir da fração SMRW-100E |
| SCE-30E | - Eluída da ultrafiltração em membrana de 30kDa, a partir da fração SMRW-100E |
| SCETE-10E | - Eluída da ultrafiltração em membrana de 10kDa, a partir da fração SCE-30E |
| SCETE-SF | - Solúvel do fracionamento por Fehling |
| CTSF-EN | - Tratada com enzimas do tipo <i>endo</i> -inulinase |
| CTSN-100R | - Retida da ultrafiltração em membrana de 100kDa, a partir da fração CTSF-EN |
| CTSNCE-50R | - Retida da ultrafiltração em membrana de 50kDa, a partir do eluído em membrana de 100kDa proveniente da fração CTSF-EN |
| CCCEN-10E | - Eluída da ultrafiltração em membrana de 10kDa, a partir do eluído em membrana de 50kDa proveniente da fração CTSF-EN |
| CCCEDE-EDEAE | - Eluída da coluna cromatografica |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 PLANTAS DE USO MEDICINAL | 17 |
| 2.2 <i>Chamomilla recutita</i> | 18 |
| 2.2.1 História | 20 |
| 2.2.2 Usos | 20 |
| 2.2.3 Efeitos biológicos | 21 |
| 2.3 POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL | 22 |
| 2.3.1 Hemiceluloses..... | 24 |
| 2.3.2 Pectinas..... | 25 |
| 2.3.3 Frutanas | 27 |
| 2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL | 29 |
| 2.4.1 Atividade antinociceptiva..... | 30 |
| 2.4.2 Atividade antiúlcera gástrica | 31 |
| 2.5 POLISSACARÍDEOS DA CAMOMILA | 31 |
| 3 OBJETIVOS | 33 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 33 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 4.1 MATERIAL DE ESTUDO | 34 |
| 4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS | 34 |
| 4.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS | 35 |
| 4.3.1 Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e descongelamento..... | 36 |
| 4.3.2 Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração | 36 |
| 4.3.3 Fracionamento dos polissacarídeos pelo método de Fehling | 36 |
| 4.3.4 Tratamento enzimático | 37 |
| 4.3.5 Cromatografia de troca iônica | 37 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS..... | 38 |
| 4.4.1 Composição monossacarídica..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.2 Carboxirredução | 38 |
| 4.4.3 Análise de metilação..... | 39 |
| 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS | 39 |
| 4.5.1 Dosagem de ácidos urônicos | 39 |
| 4.5.2 Determinação da homogeneidade e massa molar..... | 40 |
| 4.5.3 Cromatografia de camada delgada (TLC - <i>thin layer chromatography</i>)..... | 41 |
| 4.5.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS - <i>gas chromatography mass spectrometry</i>) | 41 |
| 4.5.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) | 41 |
| 4.5.6 Determinação do grau de <i>O</i> -metil esterificação e <i>O</i> -acetilação por ressonância magnética nuclear ¹ H..... | 42 |
| 4.5.7 Determinação do grau de <i>O</i> -acetilação por espectrofotometria | 43 |
| 4.5.8 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS - <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>) | 43 |
| 4.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS | 43 |
| 4.6.1 Animais..... | 44 |
| 4.6.2 Atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos | 44 |
| 4.6.3 Atividade antiúlcera no modelo de indução de lesão gástrica aguda por etanol em ratos | 45 |
| 4.6.4 Atividade locomotora no modelo de campo aberto com camundongos..... | 45 |
| 4.6.5 Análise Estatística..... | 45 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 46 |
| 5.1 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA CAMOMILA | 46 |
| 5.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS..... | 64 |
| 5.2.1 Atividade antinociceptiva | 64 |
| 5.2.2 Atividade antiúlcera gástrica | 67 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 69 |
| REFERÊNCIAS..... | 70 |

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são quaisquer vegetais que contenham em um ou mais de seus órgãos, substâncias que possam ser utilizadas com finalidade terapêutica ou que seus precursores sejam utilizados para a semissíntese químico-farmacêutica (ROSSATO *et al.*, 2012). Inúmeras são as espécies vegetais conhecidas que apresentam esta finalidade e destas espécies, algumas chamam a atenção pela suas flores, que além de sua beleza apresentam importantes ações farmacológicas comprovadas, como por exemplo: a lavanda (*Lavandula spp*), que possui efeito antiséptico (MOON *et al.*, 2006); a flor de maracujá (*Passiflora incarnata*), que possui efeito antidiabético (GUPTA *et al.*, 2012); a calêndula (*Calentura officinalis*), que possui efeito antitérmico e anti-HIV (KALVATCHEV *et al.*, 1997) bem como a camomila (*Chamomilla recutita*).

Chamomilla recutita é comumente utilizada na medicina fitoterápica e está incluída nas farmacopéias de quase todos os países (LORENZI e MATOS, 2008). Seus efeitos farmacológicos conhecidos são diversos (LORENZI e MATOS, 2008; SOUSA *et al.*, 1991). Alguns dos efeitos biológicos se devem à presença dos metabólitos secundários, mas não é sabido se outras moléculas, tais como polissacarídeos, estão trabalhando em conjunto para a produção destes efeitos (SOUSA *et al.*, 1991).

Em suas características químicas, a camomila tem dois grupos de compostos como principais constituintes: os lipofílicos onde estão os componentes do óleo essencial, como o α -bisabolol, camazuleno, herniarina e também terpenos e os hidrofílicos, que tem como integrantes os flavonóides e as mucilagens, onde se engloba o grupo dos polissacarídeos (SOUSA *et al.*, 1991).

Poucos são os estudos realizados sobre a estrutura química e atividade biológica dos polissacarídeos da camomila e nenhum deles abordou a caracterização química fina destas moléculas. De acordo com as suas estruturas químicas, os polissacarídeos podem exibir um elevado número de propriedades terapêuticas, tais como anti-inflamatórias, antitumorais, imunomoduladoras, antinociceptiva, antiúlcera gástrica e outras (LIU *et al.*, 2015; YANG e ZHANG, 2009) .

Para aprimorar o conhecimento científico da espécie e corroborar a eficácia dos usos populares, o presente estudo objetivou-se na elucidação da estrutura química fina e avaliação das atividades antinociceptiva e gastroprotetora dos polissacarídeos presentes no infuso dos capítulos florais da camomila.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS DE USO MEDICINAL

O uso de plantas no tratamento de doenças e seus sintomas é feita pelo homem a milênios, devido a facilidade para obtê-las e principalmente pela transmissão do conhecimento, de seus benefícios, através das gerações (ROSSATO *et al.*, 2012). No passado várias culturas utilizavam estas plantas para a fabricação de medicamentos, empregando partes ou unicamente o vegetal como matéria prima (ODY, 1993). Nos dias atuais as plantas medicinais têm desempenhado um papel fundamental na saúde mundial, pois mesmo sendo observados grandes avanços na medicina moderna existe populações que dependem muito ou exclusivamente delas (AKERELE, 1993).

A formulação simples ou complexa de preparados com uma ou mais plantas, que são utilizadas no tratamento de doenças, são denominados fitoterápicos ou medicamentos fitoterápicos. Estas formulações contêm como ingredientes ativos partes ou derivados de plantas no estado bruto ou processado, além de determinados solventes ou conservantes como excipientes. Outra característica dos medicamentos à base de plantas é a sua ampla utilização terapêutica de fácil aceitação por parte da população, mesmo que normalmente os princípios ativos responsáveis pela sua ação farmacológica sejam desconhecidos (VANACLOCHA e FOLCARÁ, 2003).

O interesse em medicamentos derivados de vegetais, especialmente os fitoterápicos, tem aumentado de forma expressiva. Estima-se que cerca de 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de vegetais. Preparações à base de plantas medicinais são normalmente popular em países com tradição no uso, como China e Japão e também em alguns países desenvolvidos onde existem legislações adequadas para o registo e comércio de tais preparados, como Alemanha, França e Estados Unidos (CALIXTO, 2000).

No Brasil a utilização de espécies medicinais pela população é relativamente alta, assim em fevereiro de 2009 o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), na qual estão incluídas 71 espécies vegetais para uso na atenção básica à saúde, com indicações e instruções para preparo destas plantas. A finalidade da Rennisus é estimular estudos e pesquisas que possam auxiliar na elaboração de uma lista de plantas medicinais e fitoterápicos com sua eficácia comprovada

para serem disponibilizados à população (BRASIL, 2009). A espécie *Chamomilla recutita* [L.] Rauschert, de interesse neste estudo, está incluída na lista de plantas selecionadas pelo SUS.

2.2 *Chamomilla recutita*

Chamomilla recutita [L.] Rauschert (FIGURA 1), geralmente denominada camomila vulgar, também pode ser conhecida popularmente como camomila-romana, maçanilha, camomila-comum, camomila alemã, camomila-dos-alemães, camomila-verdadeira, camomila-legítima, camomila-vulgar e matricária (LORENZI e MATOS, 2008). Em sua divisão taxonômica segundo Cronquist (1988) (TABELA 1) a espécie é denominada *Matricaria recutita* Linné e possui sinonímias como *Matricaria recutita* L., *Matricaria chamomila* L., *Matricaria chamomila* var. *recutita* (L.) Grierson, *Matricaria courrantiana* DC., *Chamomilla chamomilla* (L.) Rydb. e *Matricaria suaveolens* L., porém segundo as regras internacionais para nomenclatura botânica o nome legítimo da espécie é *Chamomilla recutita* [L.] Rauschert (RAUSCHERT, 1990).

Em suas características botânicas a camomila é descrita como uma erva anual, monóica, glabra, ereta, muito ramificada e com até 90 cm de altura. Possui folhas alternas, bi a tripinatissectas, com os segmentos lineares, agudos, verde-claros e lisos na face superior. Sua inflorescência é em capítulos, com dois tipos de flores agrupadas em corimbos, sendo as flores centrais hermafroditas, actinimorfas, de corola tubulosa, amarela e as flores marginais femininas, zigomorfas, de corola ligulada, branca. Suas lígulas são tridentadas no ápice com até 1 cm de comprimento por 3 mm de largura, as flores agrupadas sobre receptáculo cônico e oco. Os frutos do tipo aquênio, cilindro e truncado no ápice (CORRÊA JÚNIOR *et al.*, 1991; LORENZI e MATOS, 2008).



FIGURA 1. FOTO DE UMA PLANTAÇÃO DE CAMOMILA, LOCALIZADA EM CAMPO LARGO - PR E EM DETALHE UM CAPÍTULO FLORAL. FONTE: O AUTOR.

QUADRO 1 - DIVISÃO TAXÔNOMICA DA CAMOMILA SEGUNDO CRONQUIST (1988)

| Categoria | Denominação |
|------------------|---|
| divisão | Magnoliophyta |
| classe | Magnoliopsida |
| subclasse | Asteridae |
| ordem | Asterales |
| família | Asteraceae |
| gênero | <i>Matricaria</i> |
| espécie | <i>M. recutita</i> L. |
| sinonímia | <i>M. chamomila</i> L., <i>M. chamomila</i> var. <i>recutita</i> (L.) Grierson, <i>M. courrantiana</i> DC., <i>Chamomilla chamomilla</i> (L.) Rydb., <i>M. suaveolens</i> L. e <i>Chamomilla recutita</i> |

2.2.1 História

O efeito curativo da camomila já é conhecido por médicos a cerca de 2500 anos. A primeira descrição da planta foi feita por Hipócrates no século 5 a.C. e a espécie aparece como uma planta medicinal na obra *De Materia Medica* escrito por Dioscorides no primeiro século, porém a primeira menção da espécie foi encontrada no famoso tratado médico do antigo Egito “*Ebers Papyrus*”.

Na Grécia, a camomila crescia em abundância diferenciando-se desde cedo pelo seu aroma peculiar e acreditava-se que tinha ação abortiva, o que foi desmentido por Dioscorides. Essa crença falsa foi mais tarde adotada pelos romanos e árabes, por isto o nome latino *Matricaria*, que poderia derivar de duas palavras: “*mater*” traduzido como “mãe”, ou “*matrix*” traduzido como “útero” (FRANKE, 2005; PETROVSKA, 2012). Galen e Asclépio descreveram a aplicação da infusão de camomila como curativa durante muito tempo. Notas sobre camomila encontram-se bem legíveis nos escritos “*Palladius*” que remonta do século 4 ou 5, além de que as aplicações médicas da planta continuaram por toda Idade Média (FRANKE, 2005).

Acredita-se que a camomila tenha origem nos campos europeus, onde nasce espontaneamente até os dias atuais. Ela é uma das espécies mais antigas a ser utilizada na medicina européia e hoje está incluída nas farmacopéias de quase todos os países (LORENZI e MATOS, 2008).

A camomila foi trazida para o Brasil há mais de 100 anos por imigrantes europeus (poloneses, alemães, italianos, ucranianos, entre outros) que trouxeram também os costumes do consumo e as técnicas utilizadas na plantação da espécie. Ela foi introduzida na região Sul, especialmente no Estado do Paraná que é o pioneiro no cultivo, sendo no país destacada como a planta medicinal mais cultivada, onde o próprio Estado do Paraná é o maior produtor (CORRÊA JÚNIOR e TANIGUCHI, 1992).

2.2.2 Usos

Para fins terapêuticos, tanto na medicina como no uso popular, a parte utilizada constitui-se principalmente dos capítulos florais, devidamente secos e armazenados. Estes são utilizados na forma de infusão ou decocto, como tônico amargo, digestivo, sedativo, para facilitar a eliminação de gases e/ou para estimular o apetite, no tratamento de cólicas,

no tratamento de feridas ou doenças da pele como cicatrizante, como aromatizante, como clareador para cabelos e principalmente como anti-inflamatório. Nestes usos o extrato pode ser administrado por via oral, tópica ou ambos (LORENZI e MATOS, 2008; SOUSA *et al.*, 1991).

Industrialmente a infusão dos capítulos florais ou o próprio óleo essencial são empregados: em preparações farmacêuticas de uso tópico, como pomadas e cremes para promover a cicatrização da pele; fármacos que promovem o alívio da inflamação das mucosas orais, antiviróticos para tratamento do herpes e principalmente para extração da essência, que tem largo emprego como aromatizante na composição de sabonetes, perfumes, xampus e loções, bem como para conferir melhor odor e sabor a uma variada gama de alimentos (LORENZI e MATOS, 2008).

2.2.3 Efeitos biológicos

A camomila possui várias propriedades farmacológicas comprovadas por estudos científicos. Estes foram desenvolvidos em modelos *in vivo* ou *in vitro*, utilizando extratos brutos ou também componentes químicos específicos obtidos a partir da espécie. A propriedade farmacológica mais relatada deste vegetal é a atividade anti-inflamatória, que foi comprovada, principalmente, devido a grande quantidade encontrada da substância α -bisabolol. Esta substância provocou uma forte diminuição em edemas de pata realizados em camundongos, confirmando seu efeito biológico (LEITE *et al.*, 2011). Já com os extratos foram observadas a ação sedativa, onde a fração testada provocou a diminuição da mobilidade de camundongos sem perda da coordenação motora (LOGGIA *et al.*, 1982; AVALLONE *et al.*, 2000); ação imunomoduladora, onde a fração testada mostrou um forte aumento na proliferação de linfócitos *in vitro* (AMIRGHOFAN *et al.*, 2000); cicatrizante, onde a fração testada estimulou a re-epitelização e formação de fibras de colágeno em feridas orais provocadas em ratos (DUARTE *et al.*, 2011); bacteriostática, onde a fração testada diminuiu o crescimento e mobilidade de bactérias *in vitro* (ROBY *et al.*, 2013); anti-diarréia, onde a fração testada teve um efeito protetor contra a diarréia induzida por óleo castor em ratos (SEBAI *et al.*, 2014); antioxidante, onde a fração testada diminuiu o status oxidativo de cérebros de ratos (ALIBABAEI *et al.*, 2014) e anti-alérgica, onde a fração testada mostrou potente inibição da liberação de histamina a partir de mastócitos em ratos (CHANDRASHEKHAR *et al.*, 2011).

2.3 POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL

Os constituintes químicos dos vegetais, são divididos em dois grupos: os compostos primários, que são componentes essenciais para o crescimento e desenvolvimento do organismo e o secundários, que são componentes derivados dos compostos primários que fornecem vantagens ecológicas, aparentemente sem fazer parte do metabolismo do organismo (BALANDRIN *et al.*, 1985). Dentro dos componentes primários se encontram os carboidratos, que podem ser observados como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, sendo classificados em estruturais ou de reserva, de acordo com a sua função (AVIGAD e DEY, 1997).

Os carboidratos estruturais são, depois da água, os principais constituintes químicos de quase todas as células e tecidos vegetais. Eles formam a massa do vegetal promovendo sua estruturação e suporte, constituindo a parede celular. Por conseguinte, os carboidratos estruturais das plantas, juntos, formam a mais abundante reserva de compostos naturais disponíveis na Terra e são claramente nosso mais importante recurso natural renovável (REID, 1997).

A parede celular vegetal é um envoltório presente em praticamente todas as células vegetais, ela é uma estrutura dinâmica, cuja morfologia, configuração e propriedades são alteradas de modo contínuo ao longo do desenvolvimento celular em resposta ao crescimento, diferenciação, ambiente e atividades da célula (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Células vegetais jovens apresentam uma parede celular fina e elástica de fundamental importância no processo de crescimento da célula, denominada parede primária. Na fase final do crescimento e desenvolvimento da célula ocorre a formação da parede secundária que é mais espessa e forte, conferindo rigidez e forma aos tecidos vegetais (ALBERSHEIM *et al.*, 1996). Estas estruturas são altamente organizadas, constituídas por complexas moléculas como proteínas, substâncias aromáticas e polissacarídeos. Destes compostos os polissacarídeos são os principais, constituindo cerca de 90% de toda a estrutura. Eles aparecem de várias formas e são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA e McCANN, 2002).

A composição da parede celular primária das dicotiledôneas geralmente é de 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% material péctico, 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos (FIGURA 2). Já a parede celular

secundária, muito mais espessa, consiste de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e quantidade ínfima de pectinas (DEY *et al.*, 1997).

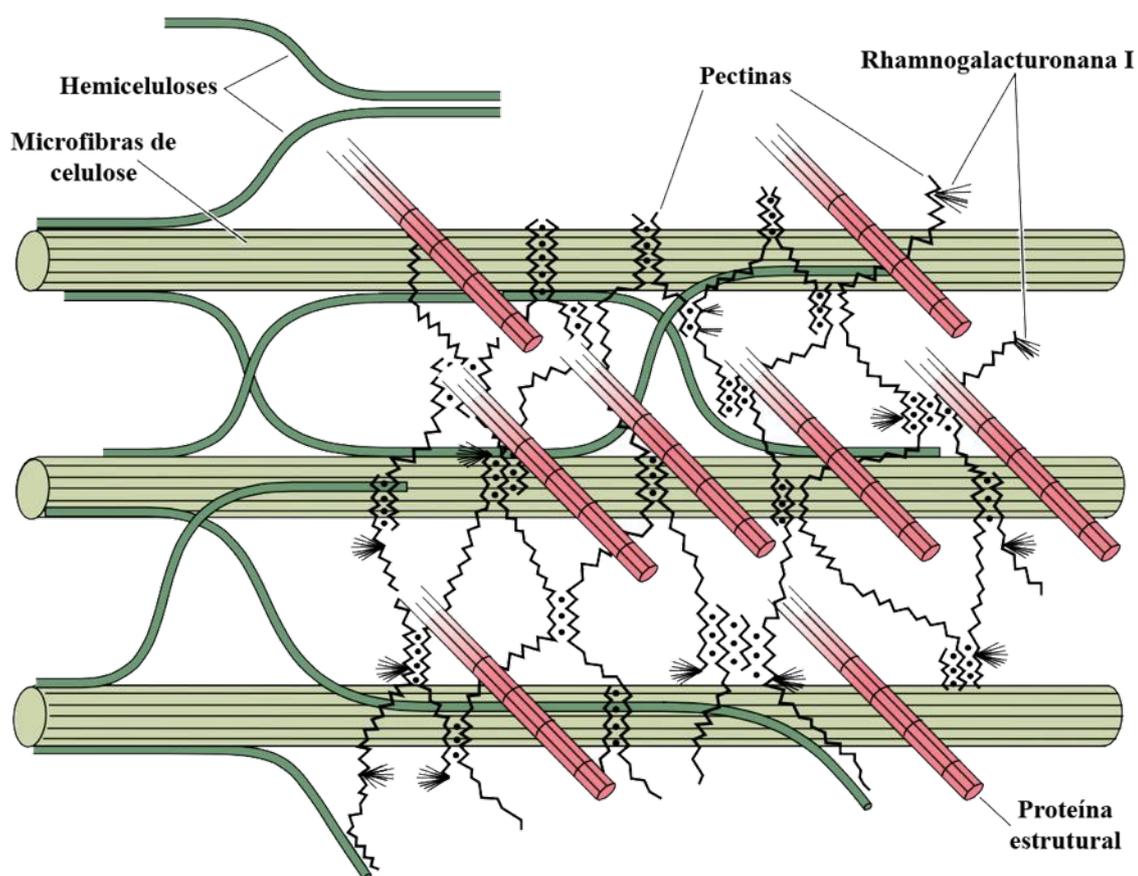


FIGURA 2. ESQUEMA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA ADAPTADO DE BRETT E WALDRON (1996).

Além dos carboidratos estruturais, as plantas também possuem aqueles que são chamados de reserva. Estes são acumulados em tecidos diferenciados do vegetal com a função de fornecer substrato para ser utilizado metabolicamente durante o crescimento e desenvolvimento da planta. O substrato pode ser armazenado na forma de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, tendo como exemplo a sacarose, as frutanas e o amido, respectivamente. Além destes polímeros existem também os polissacarídeos de reserva presentes na parede celular, os quais apresentam a estrutura semelhante aos carboidratos que formam a estrutura da parede, mas que desempenham junto com a função estrutural a função de reserva, como por exemplo as xiloglucanas e as galactomananas (AVIGAD e DEY, 1997).

2.3.1 Hemiceluloses

O termo hemicelulose é geralmente atribuído aos polissacarídeos da parede celular que estão associados à celulose e à lignina, porém existem autores que se referenciam à esse grupo como polissacarídeos que são extraídos da parede celular depectinada por um alcali forte. A principal função das hemiceluloses, em tecidos vegetais, é unir as microfibrilas de celulose (ASPINAL, 1969; REID, 1997; WILKIE, 1979).

Vários tipos de hemiceluloses podem ser encontrados na parede celular vegetal e diferentes tecidos de diferentes espécies também variam na sua composição, isto torna as hemiceluloses um grupo heterogêneo de polissacarídeos. Estes polímeros são constituídos por longas cadeias, geralmente com numerosas ramificações curtas constituídas de uma ou várias unidades monossacarídicas, que normalmente são diferentes daquelas que constituem a cadeia principal (REID, 1997; TAIZ e ZEIGER, 2010).

Os principais monossacarídeos que compõem os polímeros de hemicelulose são D-xilose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, D-manose, ácido D-glucurônico e ácido 4-*O*-metilglucurônico (ALBERSHEIM *et al.*, 1996). Os monossacarídeos da cadeia principal são unidos por ligação do tipo β -(1 \rightarrow 4), tornando esta uma característica comum a todos os polissacarídeos hemicelulósicos (HARRIS e STONE, 2008).

As xilanas, mananas e xiloglucanas são exemplos comuns de polímeros hemicelulósicos. Xilanas possuem cadeias lineares com unidades D-xilopiranosose β -(1 \rightarrow 4) ligadas, podendo também ser encontradas como: arabinoxilanas, glucuronoarabinoxilanas e glucuronoxilanas, quando possuem cadeias laterais curtas de L-arabinose, ácido D-glucurônico e/ou ácido 4-*O*-metilglucurônico e homoxilanas quando não possuem ramificações. Estes polímeros também podem possuir o grupamento acetil em sua estrutura (CAFFALL e MOHNEN, 2009).

As mananas geralmente aparecem na parede celular vegetal primária como glucomananas e galactoglucomananas. As glucomananas são moléculas lineares que possuem cadeia principal constituída por unidades alternadas de D-glucose e D-manose com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4), enquanto as galactoglucomananas possuem pequenas cadeias laterais de unidades de D-galactose. De maneira semelhante as xilanas, as mananas podem possuir, além de cadeias laterais simples, grupos acetil. Estes polímeros são geralmente pequenos com aproximadamente 100 unidades monossacarídicas, eles possuem uma estrutura tridimensional semelhante à celulose e junto com a função estrutural fazem

o importante papel de polissacarídeos de armazenamento (AVIGAD e DEY, 1997; CAFFALL e MOHNEN, 2009; REID, 1997).

Em dicotiledóneas, as xiloglucanas são as hemiceluloses mais abundantes (TAIZ e ZEIGER, 2010). As xiloglucanas são formadas por uma estrutura composta por uma cadeia principal com unidades de D-glucopiranosose β -(1 \rightarrow 4)-ligadas com cadeias laterais curtas formadas por unidades de D-xilose e/ou D-galactose, e frequentemente uma D-fucose terminal (TAIZ e ZEIGER, 2010; BUCKERIDGE, 2010). Em gramíneas, as paredes celulares contêm apenas pequenas quantidades de xiloglucanas e pectinas, estes polímeros geralmente são substituídos por glucuronoarabinoxilanas e β -glucanas (TAIZ e ZEIGER, 2010).

2.3.2 Pectinas

Assim como as hemiceluloses, as pectinas constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos. Elas são moléculas complexas que possuem como principais constituintes ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose, sendo a principal característica do grupo a presença de unidades de ácido D-galacturônico (GalpA) em sua estrutura. Estes polímeros são os mais solúveis entre os polissacarídeos que constituem a parede celular vegetal, podendo ser facilmente extraídos com água quente ou quelantes de cálcio (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990).

As pectinas são moléculas de alta massa molar que estão localizadas em maior parte na lamela média das paredes celulares vegetais, neste local elas são de suma importância para a adesão celular, e também na parede celular primária, onde contribuem para a retenção de água e formação de géis, atuando nas propriedades mecânicas da parede celular. Estas características fazem as pectinas influenciarem no crescimento, na morfologia, no desenvolvimento e também na defesa da planta (CARPITA e MCCANN, 2002; COSGROVE, 2005).

Os polissacarídeos que fundamentam o grupo das pectinas são as homogalacturonanas, também denominadas de ácidos poligalacturônicos, as ramnogalacturonanas do tipo I e as ramnogalacturonanas do tipo II (FIGURA 3). Polímeros como arabinanas, galactanas e/ou arabinogalactanas também são freqüentemente encontradas em frações pécticas, pois podem constituir as cadeias laterais

das ramnogalacturonanas do tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993; TAIZ e ZEIGER, 2010).

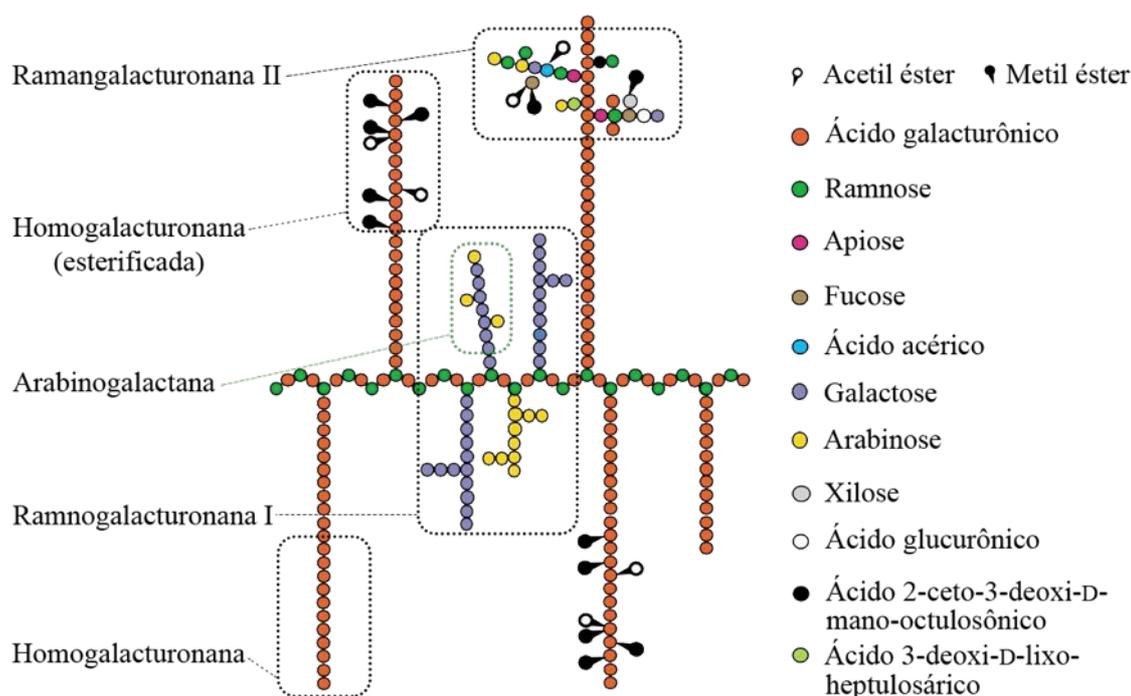


FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS PECTINAS, ADAPTADO DE WILLATS E COLABORADORES (2006).

As homogalacturonanas são homopolímeros lineares formados por unidades de ácido D-galacturônico (GalA) α -(1→4)-ligados, que podem conter cerca de 200 unidades e ter cerca de 100 nm de comprimento. Geralmente algumas unidades de GalA são metil-esterificadas e dependendo do tipo de planta, estas unidades também podem ser parcialmente O-acetiladas (CARPITA e GIBEAUT, 1993; RIDLEY *et al.*, 2001). A relação entre a quantidade total de unidades de GalA e a quantidade de unidades metil-esterificadas presentes no polímero é expressa como grau de esterificação (DE). Conforme o DE, as pectinas são divididas em dois grupos: pectinas com alto teor de metil-esterificação (HM – *High methoxyl*) que possuem DE superior a 50%, e pectinas com baixo teor de esterificação (LM – *Low methoxyl*), que possuem DE inferior a 50% (SILVA e RAO, 2006).

Ramnogalacturonanas do tipo I são polímeros heterogêneos, altamente ramificados e formados por uma cadeia principal de unidades de ácido D-galacturônico α -(1→4)-ligados e L-ramnose α -(1→2)-ligados que se alternam, onde se ligam cadeias laterais neutras de homopolímeros e heteropolímeros, tais como as arabinanas, galactanas e arabinogalactanas. Nas cadeias laterais também podem estar ligados unidades de

monossacarídeos distintos, como a D-xilose, D-glucose, D-manose, L-fucose e ácido D-glucurônico (CARPITA e GIBEAUT, 1993; SILVA e RAO, 2006; VORAGEN *et al.*, 1995).

As arabinogalactanas além de compor as cadeias laterais das ramnogalacturonanas do tipo I podem ser encontradas independentemente, sendo assim, podem ser considerados polissacarídeos pécnicos ou hemicelulósicos. Conforme sua estrutura estes polímeros podem ser classificados em dois grupos: as arabinogalactanas do tipo I, que possuem uma cadeia linear de unidades piranosídicas de D-galactose β -(1 \rightarrow 4)-ligadas com cadeias laterais curtas formada por 20-40% de unidades furanosídicas de L-arabinose α -(1 \rightarrow 5)-ligadas e conectadas na posição O-3 das unidades de D-galactose e as arabinogalactanas do tipo II que são constituídas por uma cadeia principal formada de unidades piranosídicas de D-galactose β -(1 \rightarrow 3)-ligadas ou ainda D-galactose β -(1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6)-ligadas, altamente ramificada com cadeias laterais formadas por unidades furanosídicas de L-arabinose α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 5)-ligadas, que podem estar inseridas nas posições O-3 e O-6 das unidades de D-galactose. Além disso, nas arabinogalactanas do tipo II as ramificações podem conter unidades de ácido D-glucurônico e 4-O-metil-D-glucurônico. (ASPINALL, 1969; CARPITA e GIBEAUT, 1993; CHESSON, 2006; VORAGEN *et al.*, 1995)

Ramnogalacturonanas do tipo II são os polissacarídeos mais complexos dentro do grupo das pectinas, são pequenos, contendo na sua cadeia principal 7-10 unidades de ácido D-galacturônico α -(1 \rightarrow 4)-ligados, com cadeias laterais heteropoliméricas que estão inseridas nas posições O-2 e/ou O-3. Estas cadeias laterais podem conter cerca de 12 monossacarídeos e 20 ligações diferentes, sendo os monossacarídeos mais comuns a L-ramnose, L-arabinose, D-galactose e ácido D-glucurônico. Nestes polissacarídeos pécnicos também pode ser verificada a presença de açúcares raros como, por exemplo, apiose, ácido acérico, ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico, ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico e açúcares metilados (2-O-metil-L-fucose e 2-O-metil-D-xilose) (CARPITA e GIBEAUT, 1993; VINCKEN *et al.*, 2003; YORK *et al.*, 1985).

2.3.3 Frutanas

As frutanas são, depois do amido, os carboidratos de reserva mais abundantes encontrados em plantas e mesmo com sua função de reserva, estão envolvidas em processos de proteção física do vegetal, como a tolerância ao estresse (tanto hídrico e ao

frio) e a osmorregulação (AVIGAD e DEY, 1997; HENDRY, 1987). Estas moléculas são polímeros constituídos por unidades de frutose, com ou sem unidades de glucose em sua estrutura e são essencialmente lineares, porém um baixo grau de ramificação pode ocorrer (RAO *et al.*, 2011). A extremidade inicial da cadeia destes polímeros, comumente, contém uma unidade de α -D-glucose unida por uma ligação do tipo (1 \rightarrow 2) e o tamanho da cadeia, geralmente, varia entre 2 a 50 unidades de frutose, mas é possível observar comprimentos da ordem de 200 unidades em determinadas espécies vegetais (POLLOCK e CHATTERTON, 1988). Os polímeros que contém até 10 unidades de frutose são geralmente denominados de frutooligossacarídeos (FOS) ou, de forma simplificada, oligofrutoses (HAULY e MOSCATTO, 2002)

Frutanas apresentam diferentes tipos de ligações entre as unidades de frutose e de acordo com o tipo de ligação, podem ser classificadas em inulina, levana, levana mista, inulina neoseries e levana neoseries. No tipo inulina, a estrutura do polímero é linear e consiste de unidades de β -D-frutose unidas por ligação (2 \rightarrow 1) com uma unidade inicial de α -D-glucose; no tipo levana, a estrutura também é linear com uma unidade inicial de α -D-glucose, porém apresenta ligações (2 \rightarrow 6) entre as unidades de frutose; no tipo levana mista, o polímero é geralmente linear mas pode ocorrer ramificações, a estrutura apresenta tanto ligações (2 \rightarrow 1) quanto (2 \rightarrow 6) entre as unidades de β -D-frutose na cadeia principal e também nas ramificações; no tipo inulina neoseries, verifica-se o mesmo tipo de ligação da inulina, no entanto esta possui uma unidade de glucose no centro da molécula, assim apresenta uma cadeia de frutose em ambas as extremidades da glucose (nFru-Glc-Frun) e no tipo levana neoseries, a estrutura é similar a inulina neoserie, diferenciando somente no tipo de ligação entre as unidades de β -D-frutose, que é do tipo (2 \rightarrow 6) (VIJN e SMEEKENS, 1999).

Estes polímeros também podem ser encontradas como moléculas redutoras, isto ocorre quando a unidade de D-glucose terminal está ausente do polímero, assim, para estas moléculas são utilizados os termos inulo-*n*-oses, para frutanas lineares com ligações β -(2 \rightarrow 1) e levan-*n*-oses para frutanas lineares com ligações β -(2 \rightarrow 6) (VAN LAERE e VAN DEN ENDE, 2002).

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL

Os polissacarídeos de origem vegetal têm sido usados ao longo de décadas em várias aplicações industriais, mas através de um aumento recente nas pesquisas científicas e investigações mais detalhadas é possível observar a importância destes polímeros dentro do grupo de moléculas bioativas (LIU *et al.*, 2015). Isto pois são considerados mais seguros, possuindo poucos efeitos adversos e baixa toxicidade, além de serem mais abundantes, quando comparados com polissacarídeos derivados de bactérias e fungos ou sintéticos (RAMBERG *et al.*, 2010). Estas moléculas apresentam uma alta gama de atividades biológicas já relatadas, como por exemplo: anti-inflamatória, antialérgica, antiangiogênico, antiansiedade, anticâncer, anticoagulante, anticomplementar, antidepressiva, antidiabética, antifadiga, antimicrobiana, antinociceptiva, antioxidante, antitrombótica, antitumoral, antitussígena, antiúlceras, antiviral, cardioprotetora, gastroprotetora, hepatoprotetora, hipoglicemiante, imunoadjuvante, imunomoduladora e prebiótica (AUSTARHEIM *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2011; CORDEIRO *et al.*, 2012; CHATTOPADHYAYA *et al.*, 2011; CUI *et al.*, 2013; DI *et al.*, 2013; FACCINGALHARDI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2015a; LIU *et al.*, 2014; MOLINA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2013; NI *et al.*, 2013; POVOV *et al.*, 2011; QU *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2009; TAHMOUZI e GHODSI, 2014; TANG *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2015); XU *et al.*, 2015; YOON *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013).

As atividades biológicas dos polissacarídeos são fortemente afetadas por seus parâmetros estruturais, como composição monossacarídica, configuração das ligações glicosídicas, quantidade e tamanho das ramificações e massa molar. Desta maneira a elucidação da estrutura química dos polissacarídeos é de suma importância para avaliar a relação entre os polímeros e as atividades biológicas (YANG e ZHANG, 2009).

2.4.1 Atividade antinociceptiva

O termo “nocicepção”, é utilizado para descrever a maneira que o cérebro, codifica e processa os estímulos danosos ao próprio organismo, sendo em 2008 definido pela IASP (Associação internacional para o estudo da dor) como “o processo neural de codificação e processamento de um estímulo nocivo” (LOESER e TREEDE, 2008). Ela é um fator crucial para garantir a sobrevivência, pois os mecanismos que envolvem o processamento nociceptivo favorecem a defesa, evitando o que pode ser prejudicial para os órgãos, tecidos ou o organismo como um todo (JULIUS e BASBAUM, 2001).

“Nocicepção” e “dor” não devem ser confundidos, porque cada um pode ocorrer independentemente do outro. Por exemplo, após anestesia local do nervo mandibular para procedimentos odontológicos, há nocicepção periférica sem dor e em um paciente com dor talâmica há dor sem nocicepção periférica. Desta maneira, a dor consiste em um fenômeno subjetivo, enquanto a nocicepção é um fenômeno fisiológico, que pode ser medido (LOESER e TREEDE, 2008; SCHAIBLE e RICHTER, 2004).

A “dor nociceptiva” é termo utilizado para o modo habitual de “dor” que é proveniente da ativação dos nociceptores, estes que estão localizados nos tecidos periféricos. A “dor inflamatória” (dor associada com inflamação ativa) se enquadra nesta categoria (LOESER e TREEDE, 2008).

Durante a inflamação, os nociceptores periféricos são sensibilizados. Isto é, no tecido normal, os nociceptores periféricos têm limiares mecânicos e térmicos relativamente altos e estímulos de alta intensidade são necessários para excitar os neurônios, já no decorrer da inflamação os limiares de excitação caem, de tal maneira que estímulos normalmente inócuos começam a excitá-los. Além disso, a inflamação também é capaz de recrutar os chamados nociceptores silenciosos, estes que não são estimulados por estímulos nocivos no tecido normal (SCHAIBLE e RICHTER, 2004).

Na busca de moléculas que atuem na diminuição da dor nociceptiva, o modelo animal da injeção intraplantar de formalina é bem utilizado, pois permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos nociceptores) e a de origem inflamatória (caracterizada pela sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios) (RODRIGUES *et al.*, 2012a). Neste modelo alguns polissacarídeos de origem vegetal com atividade já foram identificados, tais como: as galactoarabinoglucuronoxilanas (NASCIMENTO *et al.*, 2013), as arabinogalactanas (NASCIMENTO *et al.*,

2015), polissacarídeos sulfatados (RODRIGUES *et al.*, 2012b) e uma fração bruta de polissacarídeos (YE *et al.*, 2013).

2.4.2 Atividade antiúlcera gástrica

As úlceras gástricas são lesões que resultam da necrose tecidual desencadeada por isquemia da mucosa, formação de radicais livres e diminuição da entrega de nutrientes, todos causados por uma injúria vascular e/ou microvascular, como constrição, trombos ou outras oclusões (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012). Geralmente, estas lesões são formadas quando ocorre uma sobrecarga na defesa da mucosa intacta ou já prejudicada por fatores como envelhecimento e gastropatia. Esta sobrecarga é causada por fatores nocivos que podem ser endógenos, como ácido clorídrico e pepsina ou exógenos, como antiinflamatórios, etanol, fumo e infecções (MALFERTHEINER *et al.*, 2009; TARNAWSKI e AHLUWALIA 2012).

Para avaliar os efeitos de moléculas contra a úlcera gástrica, o método comumente utilizado consiste na verificação da proteção que estas moléculas proporcionam contra lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (ROBERT *et al.*, 1979). Neste modelo, diversos polissacarídeos já apresentaram atividades protetora, tais como: arabinanas (CORDEIRO *et al.*, 2012); arabinogalactanas do tipo I (MARIA-FERREIRA *et al.*, 2013); arabinoxilanas (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2011); glucofrutanas (MALAFAIA *et al.*, 2015); glucomananas (PARENTE *et al.*, 2014); glucuronoarabinoxilanas (SIMAS-TOSIN *et al.*, 2014); heteroxilanas ácidas (CIPRIANI *et al.*, 2008); homogalacturonanas (CIPRIANI *et al.*, 2009); ramnogalacturonanas com cadeias laterais consituída por arabinogalactanas do tipo II (NASCIMENTO *et al.*, 2012); ramnogalacturonanas com cadeias laterais consituída por arabinogalactanas do tipo I (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2014) e frações brutas (AUSTARHEIM *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2012).

2.5 POLISSACARÍDEOS DA CAMOMILA

Franke (2005) relata em seu livro, que grandes quantidades de polissacarídeos estão localizados nas flores da camomila em uma porção do vegetal denominado “*slime ribs*”.

Relata ainda que havia um crescente interesse nos polissacarídeos da camomila, porém poucos estudos abordando a caracterização destas moléculas foram encontrados.

Os primeiros a citarem os polissacarídeos presentes na camomila foram Gorin e Yakolev, que em 1971 mostraram que a fração aquosa bruta é composta majoritariamente por resíduos de ácido galacturônico. Os mesmos pesquisadores em 1974 constataram a presença de mais 6 monossacarídeos diferentes na fração e mais tarde em 1977 concluíram que a molécula predominante é composta de unidades GalpA (1→4)-ligadas.

Wagner e colaboradores (1984) também estudaram a fração aquosa bruta e verificaram que os polissacarídeos presentes são de elevada massa molecular (> 500.000) e fortemente ramificados, apresentando unidades de xilose β -(1→4)-ligadas e grandes quantidades de ácido 4-*O*-metil-glucurônico. Füller e Franz (1993), confirmaram a presença de grandes quantidades do ácido 4-*O*-metil-glucurônico e identificaram também uma frutana (contendo 74,3% de frutose e 3,4% de glucose), uma ramnogalacturonana fortemente ramificada (que consiste em 28% de ácido urônico) e uma arabinogalactana. A quantidade e composição dos polissacarídeos obtidos a partir de extratos aquosos da camomila varia consideravelmente na literatura, isto denota a importância de novos estudos com estas moléculas.

As frações polissacarídicas aquosas também foram testadas quanto suas atividades biológicas, apresentando ação anti-inflamatória, em camundongos por edema induzido nas orelhas com óleo de croton e efeito imunoestimulante, nos testes de depuração de carbono, fagocitose por granulócitos e efeito mitogênico (FÜLLER e FRANZ, 1993; FÜLLER *et al.*, 1993; WAGNER *et al.*, 1984).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos dos capítulos florais de camomila (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) obtidos a partir do infuso e avaliar suas atividades antinociceptiva e antiúlcera gástrica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os polissacarídeos dos capítulos florais de *Chamomilla recutita* [L.] Rauschert por infusão.
- Purificar as frações polissacarídicas.
- Caracterizar a estrutura química fina dos polissacarídeos purificados.
- Investigar a atividade antinociceptiva e antiúlcera gástrica dos polissacarídeos em modelos experimentais *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL DE ESTUDO

Um quilograma de capítulos florais, previamente secos, de *Chamomilla recutita* [L.] Rauschert foram gentilmente cedidos pela indústria Chamel Produtos Naturais. O material foi submetido a um processo de separação manual para a retirada de impurezas, tais como pedras, insetos e ervas daninhas, gerando aproximadamente 900 g de material limpo. Após esta etapa, foram acondicionados em recipientes plásticos hermeticamente fechados, e mantidos à temperatura ambiente até o momento das análises. Além disto, foi realizada a coleta de espécimes na plantação utilizada pela indústria (setembro de 2013) e depositados no Museu Botânico Municipal de Curitiba, para a confirmação da identidade botânica, sob o número 382674.

4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Para extração por infusão (chá), 68 g de material foi reservado em um béquer e 1,7 L de água destilada fervente foi adicionada (40 g/L). Após adicionar a água, o material foi levemente agitado, o béquer foi fechado com papel alumínio e deixado descansar por aproximadamente 30 minutos. A mistura obtida de cada extração foi filtrada, gerando um extrato e um resíduo, o extrato foi concentrado sob pressão reduzida com auxílio de um evaporador rotativo (65 °C) até pequeno volume e precipitado com etanol industrial (93%) na proporção de 3 volumes de álcool para 1 de extrato concentrado, gerando um precipitado e sobrenadante. O precipitado foi separado do sobrenadante por filtração com auxílio de um tecido, dialisado em membrana semipermeável (Spectrumlabs Cellulose 6-8 kDa cut-off) com água em fluxo contínuo por 24 h e liofilizado. O processo foi repetido 10 vezes e gerou a fração de polissacarídeos bruta denominada MRW. Para obtenção dos carboidratos de baixa massa o sobrenadante etanólico foi concentrado e liofilizado e gerou a fração denominada MRW-ET.

4.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos obtidos a partir da infusão foram submetidos a várias etapas para purificação, estas etapas estão resumidas no fluxograma a seguir (FIGURA 4).

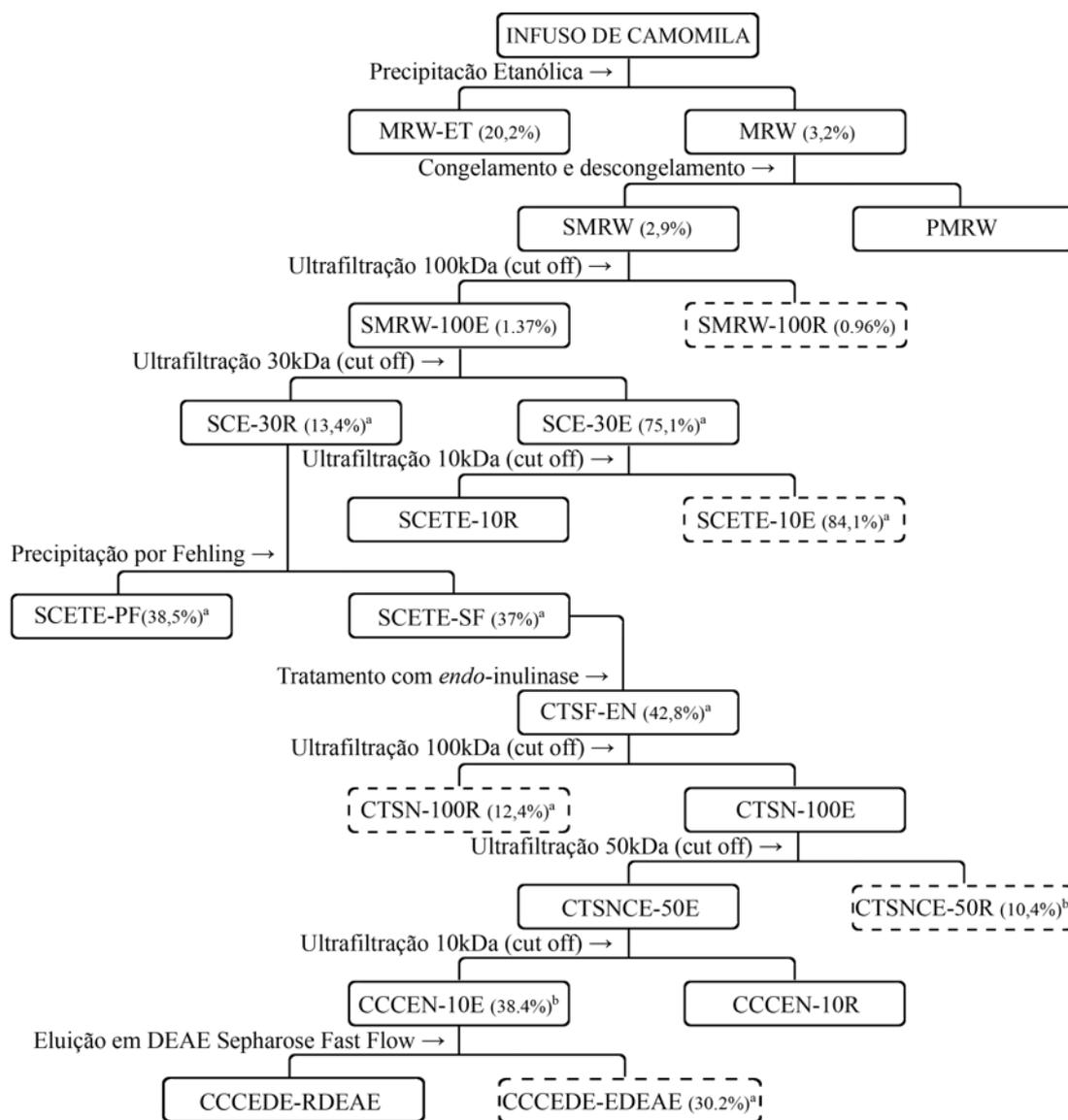


FIGURA 4. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA INFUSÃO DOS CAPÍTULOS FLORAIS DA CAMOMILA. NOTAS: Rendimento calculado a partir da amostra anterior no fluxograma (a). Rendimento calculado a partir da amostra CTSF-EN (b).

O processo de purificação foi acompanhado por análises de cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) e ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN) de todas as frações obtidas no curso da purificação.

Os rendimentos obtidos até a primeira ultrafiltração foram calculados baseados no peso seco dos capítulos florais utilizados (680 g) e os rendimentos obtidos a partir da

primeira ultrafiltração foram calculados baseados no peso seco da fração original. O índice de umidade dos capítulos florais foi obtido por liofilização (6,9%).

4.3.1 Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e descongelamento

A fração MRW foi solubilizada em água destilada, congelada e posteriormente, descongelada à temperatura ambiente. A porção insolúvel da fração foi separada por centrifugação (15.000 g por 20 min a 15 °C). Esse processo foi repetido várias vezes, até que na porção de sobrenadante não se obtivesse mais precipitado e na porção de precipitado, após tentativa de solubilização em água, fosse obtido um sobrenadante límpido. Após essas etapas, os sobrenadantes e precipitados foram reunidos, concentrados e liofilizados, gerando as frações SMRW e PMRW (GORIN e IACOMINI, 1984).

4.3.2 Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração

As frações SMRW, SMRW-100E, SCE-30E, CTSN-100E e CTSNE-50E foram submetidas ao processo de ultrafiltração utilizando membranas com limites de exclusão de 100, 30, 10, 50 e 10 kDa, respectivamente, fabricadas pela empresa Millipore e a fração CTSF-EN utilizando membrana com limite de exclusão de 100 kDa fabricada pela empresa Sartorius. Estas ultrafiltrações foram realizadas em um sistema de filtração modelo 16249 (Sartorius), acoplado a um cilindro de ar comprimido com pressão de até 10 psi para as membranas de 100 kDa e de até 30 psi para as demais. Após cada ultrafiltração foram geradas duas novas frações, uma retida e outra eluída da membrana.

4.3.3 Fracionamento dos polissacarídeos pelo método de Fehling

Foi utilizado o método de Fehling descrito por Jones e Stoodley (1965). A fração SCE-30R foi solubilizada totalmente em pequena quantidade de água destilada e foi adicionado o mesmo volume de uma mistura (1:1) das soluções A (55,7 g sulfato de cobre hidratado / 500 mL de água destilada) e B (125 g Hidróxido de potássio + 173 g tartarato de sódio e potássio / 500 mL de água destilada). Em seguida a solução foi fortemente agitada e permaneceu *overnight* em geladeira. A porção insolúvel da solução foi separada por centrifugação (16.000 g por 15 min a 10 °C). As frações geradas a partir do processo

foram neutralizadas com ácido acético glacial e dialisadas em membrana semipermeável (Spectrumlabs Cellulose 6-8 kDa cut-off) com água em fluxo contínuo por 48 horas. A fração sobrenadante (após neutralização com ácido acético glacial e diálise) foi agitada em suspensão aquosa de resina catiônica fortemente ácida por 30 minutos, neutralizada com hidróxido de amônia 20%, liofilizada e denominada SCETE-SF. O precipitado passou pelo mesmo processo e foi denominado SCETE-PF.

4.3.4 Tratamento enzimático

A fração SCETE-SF foi solubilizada em 100 ml de solução tampão acetato pH 4,6 (25,5 ml de ácido acético 0,2 M + 24,5 ml de acetato de sódio 0,2 M / 100 ml de água destilada), em seguida a solução foi aquecida em banho maria a ~ 45 °C, após a estabilização da temperatura foi adicionado 200 μ L de solução contendo enzimas do tipo *endo*-inulinase (587 U/mg, Megazyme) e mantida em agitação por 16 horas. Após o tratamento, a amostra foi dialisada em membrana semipermeável (Spectrumlabs Cellulose 6-8 kDa cut-off) com água em fluxo contínuo por 24 h e liofilizada, gerando a fração denominada CTSF-EN.

4.3.5 Cromatografia de troca iônica

Foi montada uma coluna cromatografica com aproximadamente 20 ml de resina de troca aniônica DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). Antes de injetar a amostra foi eluído 500 ml de água destilada através da coluna, para retirada da solução de conservação da resina. Após a montagem e limpeza da coluna foi adicionado diretamente sob a resina 1 ml da fração CCCEN-10E previamente solubilizada em água destilada (75mg/ml) e utilizado 300 ml de água destilada como eluente. O eluído foi concentrado e liofilizado gerando a fração denominada CCCEDE-EDEAE e o retido foi descartado.

4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

4.4.1 Composição monossacarídica.

As composições monossacarídicas foram determinadas após a hidrólise de ~ 2 mg dos polissacarídeos, com 1 mL de ácido trifluoroacético 2 M, em estufa a 100 °C, por 8 h. ou 0,5 mL de ácido trifluoroacético 0,2 M, em estufa a 80 °C, por 30 min. Após a hidrólise as soluções foram evaporadas até a secura e o resíduo dissolvido em 500 μ L de H₂O. Os monossacarídeos foram reduzidos pela adição de boroidreto de sódio até atingir pH 9,0 e levado à estufa a 100 °C por 10 min. Após este processo as amostras foram neutralizadas com ácido acético glacial, evaporadas até a secura, adicionado uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1 v/v; 1 mL) e levado à estufa a 100° C por 30 minutos. Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio, sendo retirada totalmente a piridina com solução aquosa de sulfato de cobre a 5% e a água com sulfato de sódio anidro (WOLFROM e THOMPSON, 1963a; 1963b). O clorofórmio foi evaporado a temperatura ambiente e os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS, sendo identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons.

4.4.2 Carboxirredução

Aproximadamente 5 mg dos polissacarídeos foram solubilizados em tampão MES [ácido 2-(N- morfolina)-etanosulfônico] (0,2 mol/L, pH 4,75) e, aos poucos sob agitação, foi adicionado 24 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida] para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A mistura ficou sob agitação por um total de 2 h, em seguida foi ajustado o pH para 7,0 pela adição de tampão TRIS [ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminioetano-sulfônico] (2 mol/L, pH 7,0) e foi adicionado boroidreto de sódio para uma concentração final de 2 mol/L. A redução ocorreu *overnight* e foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5. Finalmente, a amostra foi dialisada em membrana semipermeável (Spectrumlabs Cellulose 2 kDa cut-off) com água em fluxo contínuo por 24 h, concentrada e liofilizada. Todo o processo de carboxirredução foi repetido mais uma vez, para garantir a eficácia do procedimento, porém, no segundo processo, apenas a metade de carbodiimida foi utilizada (TAYLOR e CONRAD, 1972).

4.4.3 Análise de metilação

A metilação dos polissacarídeos foi realizada pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Aproximadamente 5 mg dos polissacarídeos, previamente carboxireduzidos, foram solubilizados em 1 mL de dimetil sulfoxido, excesso de hidróxido de sódio triturado e seco foi adicionado à solução, seguido pela adição de 1 mL de iodeto de metila, agitação em vórtex por 30 min e repouso por 24 h. Esse procedimento foi repetido para garantir a metilação total dos polissacarídeos. A metilação foi interrompida com água destilada e a solução foi neutralizada com ácido acético glacial. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio, lavado diversas vezes com água destilada e a água foi retirado totalmente adicionando sulfato de sódio anidro. A fase clorofórmica foi reservada em outro tubo, evaporada totalmente e o material hidrolisado.

Os polissacarídeos metilados da fração CTSN-100R foram solubilizados em 500 µL de ácido fórmico a 45% (v/v), levados à estufa a 100 °C por 18 h para hidrólise e a solução foi evaporada até a secura. Os polissacarídeos metilados da fração CCCEDE-EDEAE foram solubilizados em solução de ácido clorídrico em metanol a 3,5%, levados à estufa a 80°C por 2 horas para metanólise e a solução foi evaporada até a secura. Após seca foi adicionado 500 µL de ácido sulfúrico 0,5 M e levado à estufa a 100°C por 12 horas para hidrólise. O excesso de ácido sulfúrico na solução foi eliminado com carbonato de bário, após este procedimento a solução foi filtrada, e o filtrado límpido foi liofilizado. Após as hidrólises, foi adicionado 500 µL de água destilada nas frações e o material foi reduzido e acetilado segundo item 4.4.1 substituindo boroidreto de sódio por borodeutereto de sódio. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons quando comparado com padrões (SASSAKI *et al.*, 2005).

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Dosagem de ácidos urônicos

A determinação quantitativa de ácidos urônicos foi efetuada pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Em uma alíquota de 400 µL (100µg/ml) de solução aquosa da amostra foi adicionado 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio

4 mol/L (pH 1,6) e 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mmol/L em ácido sulfúrico). A solução foi agitada em vórtex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após resfriada até a temperatura ambiente, foi adicionado 80 µL de meta-hidroxibifenila (0,15% m/v em hidróxido de sódio 0,5% m/v) e foi novamente agitada em vórtex. Foi produzida, também, uma curva padrão utilizando ácido galacturônico ou ácido glucurônico nas concentrações 2, 5, 15, 30 µg/ml e efetuada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 525 nm. Todas as amostras e a curva foram feitas em triplicata, sendo o método sensível para 0,97 a 38,8 µg de ácido urônico.

4.5.2 Determinação da homogeneidade e massa molar

As análises de homogeneidade e determinação da massa molar foram realizados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC - *High Performance Steric Exclusion Chromatography*) da Wyatt Technology, com quatro colunas Waters ultrahydrogel 2000, 500, 250 e 120 acopladas em série (com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 , respectivamente) e um detector de índice de refração, modelo Waters 2410. Como eluente, uma solução de nitrito de sódio 0,1 mol/L contendo azida de sódio 0,2 g/L foi injetada na coluna através de uma bomba peristáltica WATERS 515 com fluxo controlado de 0,6 mL/min.

Para a análise de homogeneidade as amostras foram solubilizadas em solução idêntica a eluente para uma concentração final de 1 mg/mL, filtradas em membranas com porosidade de 0,22 µm (Millipore) e injetadas no HPSEC. Para a determinação da massa molar (Mw), as amostras com perfil de eluição homogêneo tiveram seu valor de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com relação à concentração) determinado ou calculada utilizando uma curva de calibração montada a partir de padrões de dextrana (487, 266, 124, 72,2, 40,2, 17,2 e 9,4 kDa da Sigma-Aldrich). Para obter o valor de dn/dc as amostras foram solubilizadas em solução idêntica a eluente para uma concentração final de 1 mg/mL, filtradas em membranas com porosidade de 0,22 µm (Millipore), diluídas para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL em solução idêntica a eluente e injetadas no HPSEC. Os perfis de homogeneidade, os cálculos de dn/dc e as determinações de massa molar foram analisados utilizando o software ASTRA 4.70.07.

4.5.3 Cromatografia de camada delgada (TLC - *thin layer chromatography*)

A análise de cromatografia em camada delgada foi realizada em placa de sílica gel 60G (Merck) com 10 cm de altura total. Foram aplicados *spots* de uma solução aquosa da fração MRW-ET (1mg/ml) e soluções padrões (1mg/ml) de frutose, glucose e sacarose. Para comparação, também foi aplicada uma amostra contendo frutoligossacarídeos, com grau de polimerização variando de 2 a 10, extraídos das raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) que foi gentilmente cedida pelo Dr. Larry Ladislao Ramos Paredes. Foi utilizado como fase móvel uma solução de n-propanol e água (6:1, v/v) e como revelador uma solução de orcinol (0,2 g de orcinol, em 95 mL de etanol e 5 mL de ácido sulfúrico) (SASSAKI *et al.*, 2008).

4.5.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS - *gas chromatography mass spectrometry*)

Os componentes monossacarídicos neutros ou metilados foram quantificados através de GC-MS, utilizando-se um cromatógrafo a gás Varian Sarturn 2000R - modelo 3.800 acoplado a um espectrômetro de massa de marca Varian Ion – Trap 2000R, equipados com colunas capilares de sílica fundida DB – 225 (30 m x 0,25 mm). Hélio ultrapuro foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50 °C (mantida por 1 min), seguindo-se de um aumento gradual de 40 °C/min até 210 °C e mantida por 30 minutos para acetatos de alditóis parcialmente O-metilados ou 230 °C e mantida por 15 minutos para acetatos de alditóis, sendo mantidas isotermicamente até o final da análise.

4.5.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As amostras previamente liofilizadas foram solubilizadas totalmente em D₂O (30 mg/500µL), transferidas para tubos de 5 mm de diâmetro específicos para análise e adicionado acetona como padrão interno. Os espectros de ressonância magnética nuclear ¹³C, ¹H, HSQC (*heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*), COSY (*correlation spectroscopy*) e TOCSY (*total correlation spectroscopy*) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III (Bruker), observando-se os núcleos de ¹H e ¹³C a 400,13 e 100,62 MHz, respectivamente em temperaturas de 50 °C ou 70 °C. Os deslocamentos

químicos foram expressos em δ (ppm), baseando-se no padrão interno da acetona para ^{13}C (δ 30,2), HSQC, COSY, TOCSY (δ 30,2 e 2,22 a 50 °C) e de D_2O (δ 4,20 a 70 °C) para ^1H . Os espectros foram processados e analisados com o auxílio do programa TopSpin 2.1 (Bruker).

4.5.6 Determinação do grau de *O*-metil esterificação e *O*-acetilação por ressonância magnética nuclear ^1H

O grau de metil esterificação da homogalacturonana presente na fração SMRW-100R foi determinado utilizando o método de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, segundo Grasdalen, Bakøi e Larsen (1988) e acetilação segundo An e colaboradores (2011). A amostra foi solubilizada em D_2O (10 mg/500 μL), congelada e liofilizada. Esse processo foi repetido por 4 vezes, sendo no último somente solubilizada e depois transferidas para um tubo de 5 mm de diâmetro específicos para análise de RMN. Os espectros foram obtidos a 70 °C (256 scans). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios foram expressos em relação à ressonância do deutério, em 4,20 ppm.

A quantificação de grau de *O*-metil esterificação (DE) foi feita na região de baixo campo, empregando-se a seguinte equação:

$$\text{DE (\%)} = (I_A - I_B / I_A + I_B) \times 100 \quad (1)$$

Onde I_A representa as intensidades das ressonâncias de H-1 das unidades de GalA livres assim como H-1 e H-5 das unidades de GalA esterificadas, e I_B representa a intensidade dos sinais de H-5 das unidades de GalA livres.

A quantificação de grau de *O*-acetilação (DA) foi feita na região de baixo campo, empregando-se a seguinte equação:

$$\text{DA (\%)} = [(I_{\text{CH}_3} \times 100) / 3] / I_{\Sigma}^{\text{H}^1} \quad (2)$$

Onde I_{CH_3} representa as intensidades das ressonâncias do hidrogênio no grupo $\text{CH}_3\text{-COO-}$ e $I_{\Sigma}^{\text{H}^1}$ representa a intensidade total dos sinais de H-1 das unidades de GalA.

4.5.7 Determinação do grau de *O*-acetilação por espectrofotometria

A determinação quantitativa de acetil observado na homogalacturonana presente na fração SMRW-100R foi efetuada de acordo com o método de Hestrin (1949). Em 0,5 mL de solução aquosa da fração SMRW-100R (1 mg/mL) foi adicionado 1 mL de uma solução de hidroxilamina 2 M e hidróxido de sódio 3,5 M (1:1) e agitado em vortex. Em seguida adicionou-se uma solução de 0,5 mL de ácido clorídrico em água (1:3) e 0,5 mL de uma solução de cloreto férrico hidratado 0,37 M em ácido clorídrico 0,1 M. Foi produzida, também, uma curva padrão utilizando β -D-galactose pentaacetato nas concentrações de: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7 mg/mL e efetuada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Todas as amostras e a curva foram feitas em triplicata sendo a sensibilidade do método de 0,04 a 5 μ M de acetil/mL.

4.5.8 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS - *electrospray ionization mass spectrometry*)

A amostra MRW-ET foi solubilizada (\sim 2 mg/ml), posteriormente diluída na proporção de 1:10 em água deionizada e foi inserida na fonte de ionização do instrumento (5 μ L/min) para análise em infusão direta. Os espectros foram obtidos em modo de ionização positivo, utilizando um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific), empregando como parâmetros: voltagem do spray, 4000 V; voltagem do capilar, 25 V; temperatura do capilar, 300 °C; *Tube lens*, 125 V; *sheath gas flow rate*, 8.00 UA; *aux gas flow rate*, 2.00 UA. Foi utilizado nitrogênio de um gerador de nitrogênio (Peak Scientific) e hélio ultrapuro 6.0. Os espectros foram processados e analisados com o auxílio do programa Thermo Xcalibur versão 1.0.0.42.

4.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com as professoras Dra. Maria Fernanda de Paula Werner e Dra. Cristiane Hatsuko Baggio do Departamento Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

4.6.1 Animais

Foram utilizados ratos fêmeas *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar com peso variando entre 180 a 200 gramas e camundongos machos ou fêmeas *Mus musculus* da linhagem Swiss com peso variando entre 20 a 35 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR), acondicionados no laboratório por no mínimo 18 horas antes da realização dos testes, onde foram mantidos em sala climatizada (22 ± 2 °C) e umidade controlada, fornecido água e ração comercial *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) sob os números 657 e 809. Eles foram desenvolvidos de acordo com as diretrizes sobre cuidados com animais utilizados em laboratório (“Principles of Laboratory Animal Care” - NIH Publication 85-23, revisado 1985) e sobre ética em experimentos que causem dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e intensidade dos estímulos dolorosos utilizados foi o mínimo necessário para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos testados.

4.6.2 Atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos

Camundongos machos ou fêmeas foram colocados individualmente em funis de vidro e mantidos por um período de 10 min para aclimação, seguindo a metodologia de Rodrigues e colaboradores (2012a). Em seguida, grupos de camundongos foram tratados por via intraperitonal com a fração polissacarídica (doses de 1 - 100 mg/kg, i.p.), 30 min antes da injeção de 20 µL de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita. Após a injeção da formalina, os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observados durante 0-5 min (Fase I) e 15-30 min (Fase II). O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção. Dessa maneira, foram utilizados para cada fração grupos de animais controle (veículo, 0,1 mL/10 g, i.p.) e os seguintes grupos de animais tratados: fração SMRW-100R nas doses de 1, 10 e 30 mg/kg (i.p); fração SCETE-10E nas doses de 1, 3 e 100 e mg/kg (i.p.) e fração CTSN-100R nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg (i.p).

4.6.3 Atividade antiúlcera no modelo de indução de lesão gástrica aguda por etanol em ratos

Ratos fêmeas foram identificados, deixados em jejum por 18 h e tratados por gavagem com o veículo (água - 1 ml/kg), omeprazol (40 mg/kg) ou a fração polissacarídica MRW (3 - 30 mg/kg) seguindo a metodologia de Robert e colaboradores (1979). Uma hora após estes tratamentos foi administrado etanol absoluto P.A. (2,5 mL/kg) para cada animal, após a administração do etanol os animais foram sacrificados e os estômagos foram removidos. Foram utilizados os seguinte grupos de animais: veículo (água, 1 mL/kg); omeprazol (40 mg/kg) e fração polissacarídica MRW (3, 10 e 30 mg/kg). Para determinar a extensão das lesões gástricas os estômagos foram abertos, distendidos, fotografados e as lesões foram mensuradas (mm^2) por planimetria usando o software Image Tool 3.0.

4.6.4 Atividade locomotora no modelo de campo aberto com camundongos

O comportamento exploratório e atividade locomotora espontânea dos animais foram avaliadas usando o teste de campo aberto, como previamente descrito por Tadaiesky e colaboradores (2006). Os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com o veículo água (10 ml/kg) ou a fração polissacarídica CTSN-100R (10 e 30 mg/kg). Após 30 minutos os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena circular (42 cm de diâmetro e 24 cm de altura) com o assoalho demarcado em 25 setores, partindo do centro até a borda externa. A partir do momento em que o animal foi colocado no centro da arena o número de setores cruzados com todas as patas foi contado por 5 min. Após o término de cada sessão, a arena foi limpa com uma solução de etanol 10%.

4.6.5 Análise Estatística

Foi utilizado um número de 6 animais para cada grupo experimental, com exceção do teste de campo aberto que foram 4 animais para cada grupo e os resultados foram expressos como medias \pm erro padrão das medias. A significância estatística foi determinada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$, sendo as análises realizadas no software Prism versão 5.0, 2007 (GraphPad).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA CAMOMILA

Conforme a resolução RDC nº 10/2010 da ANVISA (Agência nacional de vigilância sanitária), o infuso da camomila deve ser preparado utilizando 2 gramas de capítulos florais para 100 mililitros de água, porém na literatura essa concentração varia entre 2 e 9 gramas (LORENZI e MATOS, 2008; ROSSATO *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 1991). Para obter um bom rendimento e manter o padrão utilizado no uso popular, foi utilizada a concentração de 4 gramas de capítulos florais para cada 100 mililitros de água no preparo da infusão.

O extrato obtido a partir da infusão foi concentrado e precipitado com etanol, gerando um precipitado rico em polissacarídeos e o sobrenadante etanólico contendo os carboidratos de baixa massa molar. O precipitado foi separado do sobrenadante, dialisado, liofilizado e denominado MRW, obtendo-se um rendimento de 3,2%. O sobrenadante foi concentrado, liofilizado e denominado MRW-ET, obtendo um rendimento de 20,2% (FIGURA 4).

A fração MRW, foi submetida ao processo de congelamento e descongelamento e após centrifugação foi gerada 2 frações, as quais foram separadas e liofilizadas. A fração solúvel foi denominada SMRW e obteve um rendimento de 2,9% e a fração insolúvel foi denominada PMRW (FIGURA 4). Estas frações foram submetidas à análise de composição monossacarídica e RMN, sendo que a fração PMRW não apresentou sinais referentes a carboidratos e portanto, foi descartada.

A fração SMRW apresentou na análise de composição monossacarídica principalmente ácidos urônicos e arabinose (TABELA 2). O espectro de ^{13}C -RMN da fração SMRW (FIGURA 5) mostrou: sinais em δ 61,2 (C1), δ 103,2 (C2), δ 77,5 (C3), δ 74,9 (C4), δ 81,3 (C5) e δ 62,3 (C6) atribuídos a unidades de $\rightarrow 1$)- β -D-Frucf-(2 \rightarrow ; sinais em δ 100,0 (C1), δ 68,2 (C2-C3), δ 78,6 (C4), δ 70,5 (C5), δ 170,7 (C6), δ 52,8 (-COOCH₃) e δ 20,1 (CH₃-COO-) atribuídos a unidades de $\rightarrow 1$)- α -D-GalpA-(4 \rightarrow metil esterificado com grupamentos acetil e em 99,2 (C1), δ 174,7 (C6) atribuídos a unidades de $\rightarrow 1$)- α -D-GalpA-(4 \rightarrow não metil esterificado (OLIVEIRA *et al.*, 2011; PERRONE *et al.*, 2002). Esses assinalamentos indicam a presença de uma frutana do tipo inulina e uma

homogalacturonana metil esterificada que também apresenta grupamentos acetil na fração. O espectro apresenta ainda os sinais de pequena intensidade em δ 97,7 atribuído aos carbonos anoméricos de α -D-GlcpA e em δ 107,6 e δ 109 referentes aos carbonos anoméricos das unidades de α -L-Araf (VIGNON e GEY, 1998; WAGNER e JORDAN 1988). A porcentagem de frutose (12,6%) observada na tabela 2 pode ser considerada baixa, uma vez que predominam os sinais da β -D-Frucf(2 \rightarrow 1) no espectro de 13 C-RMN da fração. Isso deve-se ao fato da frutose ser mais labil que os outros monossacarídeos e portanto pode ter sido degradada mais facilmente pelo método de hidrólise utilizado.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES

| Frações | Monossacarídeos (%) | | | | | |
|------------------------|---------------------|------|------|---------------------|------|-----------------------|
| | Rha | Ara | Xyl | Fruc ^(a) | Gal | Ác. Ur ^(b) |
| SMRW | 3,0 | 24,6 | 8,6 | 12,6 | 12,0 | 39,2 |
| SMRW-100R | 1,1 | 4,0 | 1,9 | - | 2,2 | 91,0 |
| SMRW-100E | 8,5 | 32,5 | 5,1 | 35,8 | 18 | nd. |
| SMRW-100E ^c | - | 17,9 | - | 82,1 | - | nd. |
| SCETE-10E ^c | - | 4,7 | - | 95,3 | - | nd. |
| SCE-30R | 2,6 | 18,5 | 6,9 | 16,3 | 11,6 | 44,1 |
| SCETE-SF ^c | - | 14,2 | - | 85,8 | - | nd. |
| CTSF-EN | 2,4 | 37,3 | 16,9 | 8,2 | 22,1 | 13,1 |
| CTSN-100R | - | - | 71,6 | - | - | 28,4 |
| CCCEDE-EDEAE | - | 37,4 | - | - | 58,0 | 4,6 |

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS. (a) atribui-se pela soma de manitol hexaacetato e glucitol hexaacetato (b) determinado por método espectrofotométrico segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) (c) hidrólise com TFA 0,2 M a 80°C (nd.) não determinado.

A fração SMRW foi submetida a análise de homogeneidade por HPSEC (FIGURA 6) e apresentou perfil heterogêneo, demonstrando a presença de dois grupos de moléculas de tamanhos diferentes (2 picos). A partir desta informação foi escolhido o método de ultrafiltração, utilizando membrana de 100 kDa, para dar continuidade a purificação. Este processo gerou duas frações, uma retida denominada SMRW-100R com rendimento 0,96% e outra eluída denominada SMRW-100E com rendimento 1,37% (FIGURA 4).

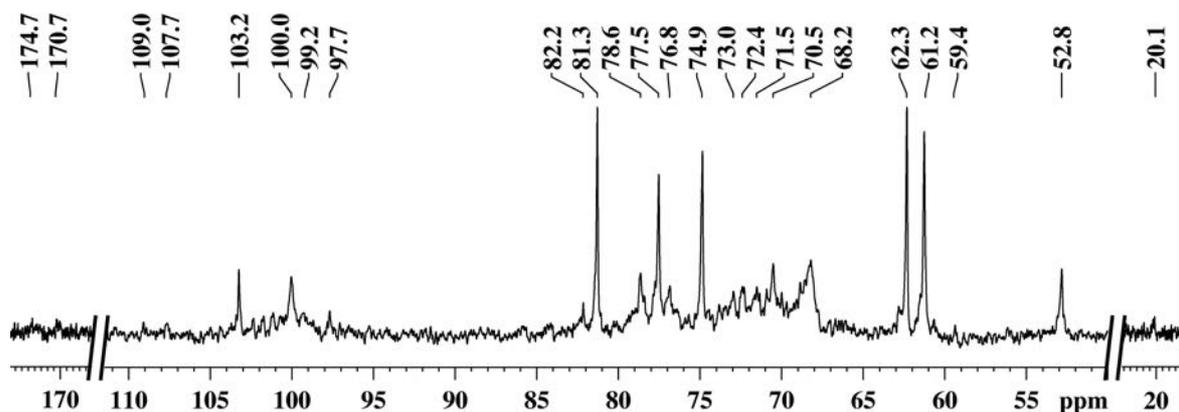


FIGURA 5. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DA FRAÇÃO SMRW EM D_2O , A $70\text{ }^\circ\text{C}$, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

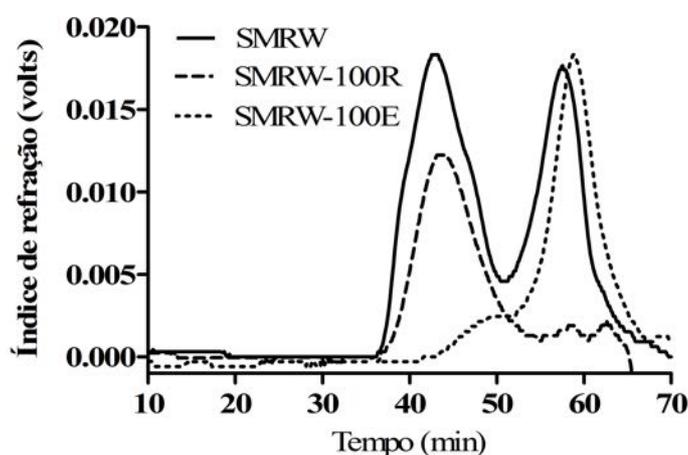


FIGURA 6. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES SMRW, SMRW-100R e SMRW-100E, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

A análise de homogeneidade por HPSEC da fração SMRW-100R (FIGURA 6) apresentou perfil homogêneo, mostrando que a ultrafiltração foi eficiente para purificar esta fração. Também foi realizada a análise de dn/dc (0.185) e a massa molar calculada em 571kDa. A fração SMRW-100R apresentou na análise de composição monossacarídica, principalmente ácidos urônicos (TABELA 2). Pelo espectro de ^{13}C -RMN (FIGURA 7A) pode-se constatar a presença da homogalacturonana observada na fração SMRW devido a presença dos sinais em δ 100,1 (C1), δ 68,1 (C2-C3), δ 78,7 (C4), δ 70,5 (C5), δ 170,7 (C6) δ 52,8 (-COOCH₃), δ 20,3 (CH₃-COO-) atribuídos a unidades de $\rightarrow 1$ - α -D-GalpA-(4 \rightarrow metil esterificado com grupamentos acetil e em δ 99,2 (C1) e 70,2 (C5) atribuídos a unidades de $\rightarrow 1$ - α -D-GalpA-(4 \rightarrow livres (PERRONE *et al.*, 2002; POPOV *et al.*, 2011; VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009).

Devido à presença de unidades de α -D-GalpA metil-esterificadas com grupamentos acetil, o grau de metil-esterificação (DM) e o grau de acetilação (DA) foram determinados pelos métodos de Grasdalen, Bakøi e Larsen (1988) e An e colaboradores (2011)

respectivamente. Através da integração dos hidrogênios no espectro de ^1H -RMN da fração SMRW-100R (FIGURA 8), o valor de DE foi de 87% e DA foi de 19%, podendo considerar esta molécula uma pectina altamente metil-esterificada (HM) e acetilada. O método de integração de hidrogênios, para grau de acetilação, é pouco utilizado para homogalacturonanas e por isto foi utilizado o método espectrofotométrico de Hestrin para verificação, obtendo-se resultados concordantes.

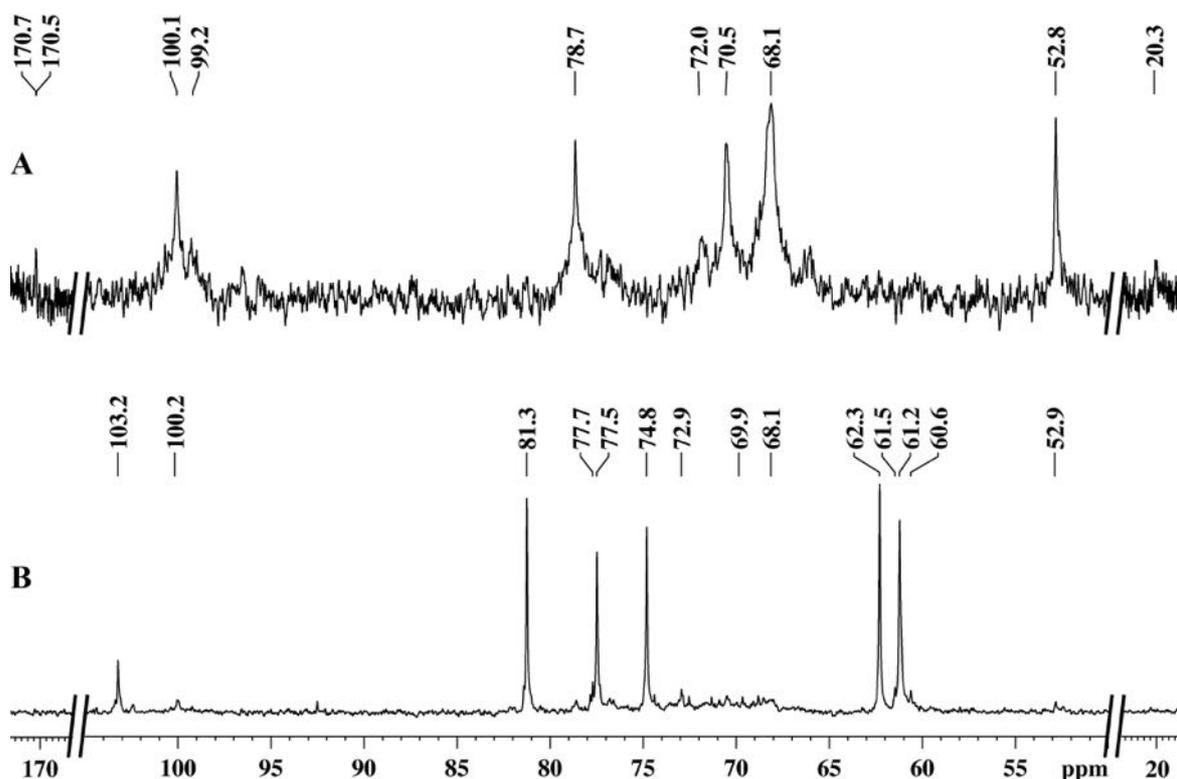


FIGURA 7. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES SMRW-100R (A) E SMRW-100E (B) EM D_2O , A 70°C , COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

Com base nas análises realizadas, é possível afirmar que a fração é composta por uma pectina linear (homogalacturonana) de alta massa molar, que consiste em uma cadeia principal composta por unidades de ácidos galacturônicos (1 \rightarrow 4)-ligados, sendo 87% deles metil esterificados e 19% com grupamentos acetil. Gorin e Yakolev (1977) já haviam observado a presença de um polímero composto por resíduos de ácidos galacturônicos (1 \rightarrow 4)-ligados nos extratos de camomila, porém as outras características do polímero, observadas no presente trabalho não foram relatadas.

A presença de homogalacturonanas metil esterificadas e com grupamentos acetil em partes aéreas é pouco relatada na literatura, sendo encontradas apenas em alguns frutos, como o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), o cacau (*Theobroma cacao*) e pimentas doces (*Capsicum annum*). O grau de metil esterificação observado para estes polissacarídeos são

inferiores aos encontrados para homogalacturanana presente no chá da camomila, sendo 53% para a do cupuaçu, 37% e 42% para a do cacau e 50% para a das pimentas doces. Grau de acetilação superior somente foi observado para uma das homogalacturonanas presentes no cacau (29%) (POPOV *et al.*, 2011; VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009; VRIESMANN, *et al.*, 2011).

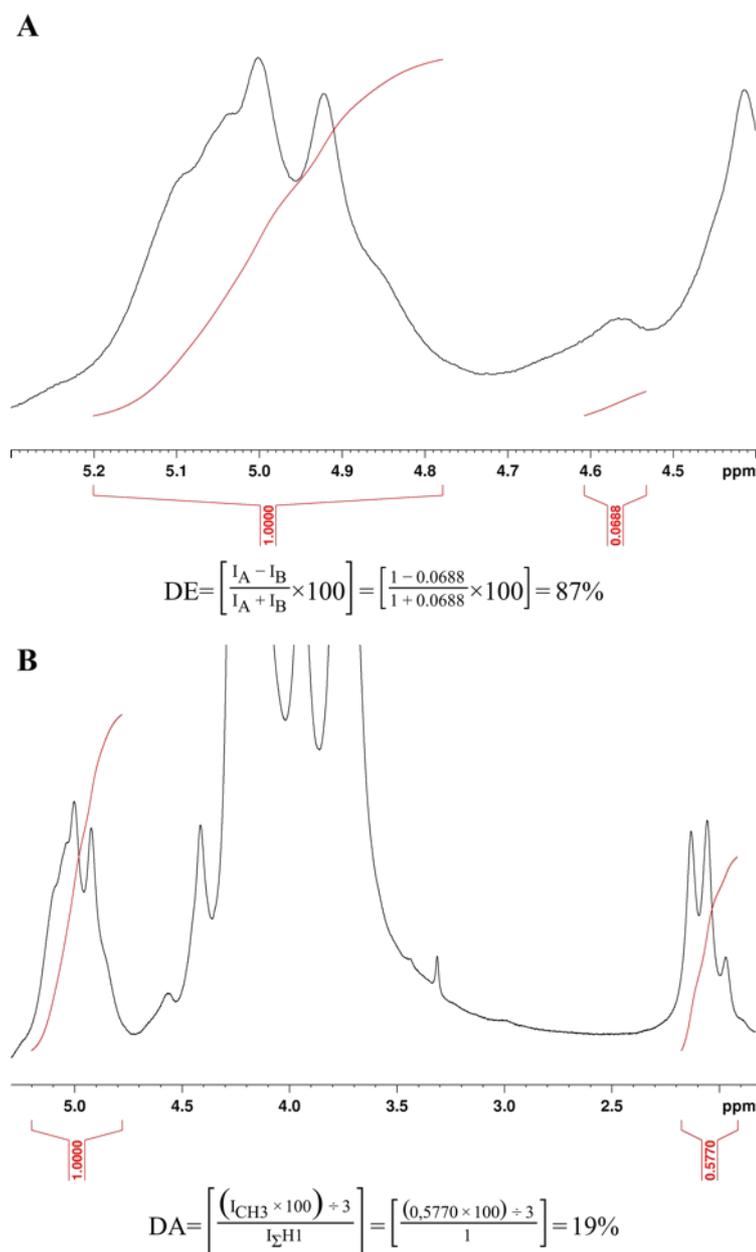


FIGURA 8. REGIÃO DE CAMPO BAIXO DO ESPECTRO DE ^1H -RMN DA FRAÇÃO SMRW-100R. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE METIL-ESTERIFICAÇÃO (A) E ACETILAÇÃO (B).

A fração SMRW-100E apresentou na análise de composição monossacarídica, principalmente frutose e arabinose (TABELA 2). O espectro de ^{13}C -RMN desta fração

(FIGURA 7B) apresentou todos os sinais, observados anteriormente na fração SMRW, atribuídos a unidades de $\rightarrow 1$)- β -D-Frucf-(2 \rightarrow e traços dos sinais das unidades $\rightarrow 1$)- α -D-GalpA-(4 \rightarrow . A partir dos sinais observados no espectro de ^{13}C -RMN da fração SMRW-100E (FIGURA 7B) é possível constatar que houve uma degradação da frutose no preparo da amostra para análise de composição monossacarídica, isto pois ocorreu a prevalência dos sinais da frutose no espectro, enquanto na composição monossacarídica a arabinose e frutose estão presentes em quantidades iguais. Desta maneira a análise de composição monossacarídica foi repetida utilizando um tempo de hidrólise menor (30 min.) e uma baixa concentração do ácido (0,2 M), para que a frutose presente nesta fração não se degradasse. Após esta segunda análise o principal monossacarídeo observado foi a frutose (TABELA 2).

A análise de homogeneidade por HPSEC desta fração (FIGURA 6) apresentou perfil heterogêneo. Com intuito de obter um perfil homogêneo e isolar a frutana, a fração foi ultrafiltrada, utilizando membrana de 30 kDa. A ultrafiltração gerou duas novas frações, uma eluída denominada SCE-30E com rendimento de 75,1% e uma retida denominada SCE-30R com rendimento de 13,4% (FIGURA 4).

Os resultados obtidos a partir da fração SCE-30E, por análises de ^{13}C -RMN, HPSEC e composição monossacarídica (dados não mostrados), foram extremamente similares aos obtidos para fração SMRW-100E e por isto foi continuada a purificação por ultrafiltração, porém utilizando membrana de 10 kDa. Este processo gerou duas novas frações, uma retida que devido ao baixo rendimento foi descartada (SCETE-10R) e uma eluída denominada SCETE-10E com rendimento de 84,1% (FIGURA 4).

A análise de composição monossacarídica da fração SCETE-10E apresentou principalmente frutose (TABELA 2). O espectro de ^{13}C -RMN desta fração (FIGURA 9) mostrou sinais bem definidos em δ 61,2 (C1), δ 103,2 (C2), δ 77,5 (C3), δ 74,9 (C4), δ 81,3 (C5) e δ 62,3 (C6) atribuídos a unidades de $\rightarrow 1$)- β -D-Frucf-(2 \rightarrow e ainda sinais de pequena intensidade atribuídos a unidades de α -D-GalpA (OLIVEIRA *et al.*, 2011; PERRONE *et al.*, 2002). A análise de homogeneidade por HPSEC apresentou um perfil heterogêneo (FIGURA 10).

Com base nas análises é possível afirmar que a fração SCETE-10E é composta majoritariamente por uma frutana do tipo inulina, que consiste em uma cadeia linear composta por unidades $\rightarrow 1$)- β -D-Frucf-(2 \rightarrow .

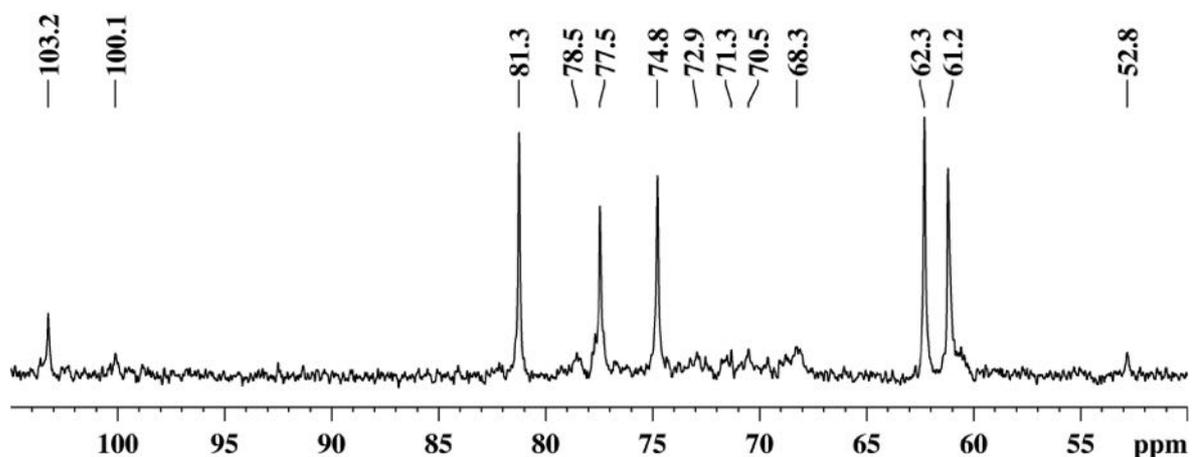


FIGURA 9. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DA FRAÇÃO SCETE-10E EM D_2O , A $70\text{ }^\circ\text{C}$, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

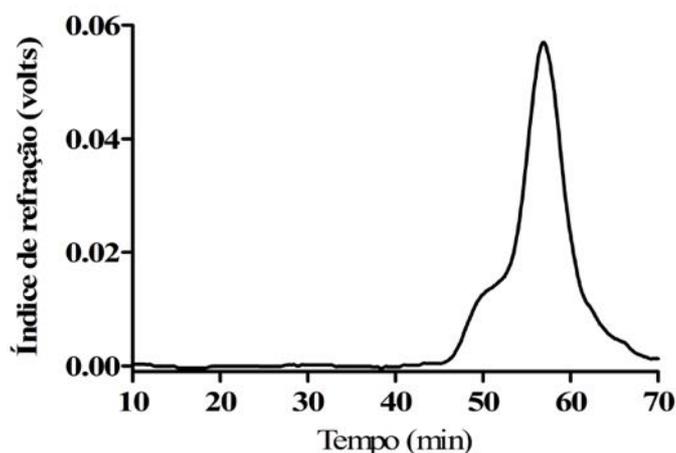


FIGURA 10. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO SCETE-10E, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

Com intuito de verificar a presença de frutanas de baixa massa molar (frutooligossacarídeos) no infuso proveniente dos capítulos florais da camomila, foi realizada uma análise de TLC com a fração obtida a partir do sobrenadante etanólico MRW-ET. Pelo perfil cromatográfico (FIGURA 11) obtido a partir desta análise foi observado a presença de glucose, sacarose e frutose na fração MRW-ET, isto pois quando comparada com os padrões ocorre a presença de bandas cromatográficas eluídas no mesmo tempo. Foi observado na fração, também, bandas referentes a frutooligossacarídeos com grau de polimerização (DP) variando de 1 a 5 quando comparado com a fração contendo frutooligossacarídeos extraídos das raízes de yacon. Para confirmar o grau de

polimerização (DP) dos frutooligossacarídeos foi realizada a análise de ESI-MS com a fração MRW-ET.

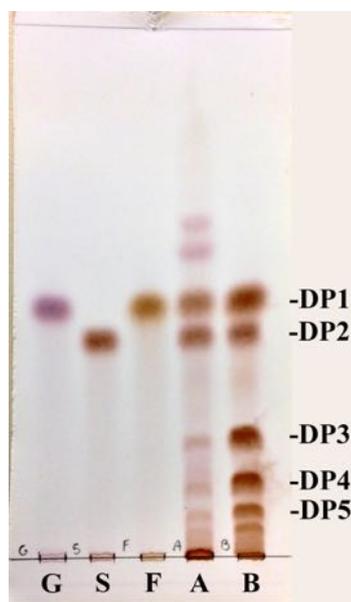


FIGURA 11. TLC DA AMOSTRA MRW-ET (A) E DOS PADRÕES GLUCOSE (G), SACAROSE (S), FRUTOSE (F) E FRACÇÃO CONTENDO FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DAS RAÍZES DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*) (B). NOTAS: Revelador orcinol- H_2SO_4 e fase móvel n-PrOH: H_2O (6:1).

O espectro de ESI-MS da fração MRW-ET (FIGURA 12), mostrou íons que variam sua massa de 381 m/z a 1839 m/z . O primeiro pico (381 m/z) corresponde a sacarose somada a massa do íon potássio (39 m/z). A soma do potássio foi necessária pois no processo de ionização aconteceu a coordenação com o cátion K^+ (presente naturalmente na fração) para a formação de uma molécula cationizada $(\text{M}+\text{K})^+$. Os picos posteriores apresentam uma diferença de massa de 162 m/z , o que corresponde a adição de um resíduo de frutose. A partir desta análise é possível verificar que a fração MRW-ET possui frutooligossacarídeos com DP que varia de 2 a 11.

Dentre os estudos encontrados na literatura sobre os polissacarídeos da camomila, Füller e Franz (1993) citaram a presença de uma frutana, onde também observaram que era do tipo inulina (2 \rightarrow 1 ligadas). A presença de frutooligossacarídeos na camomila, não foi relatada em nenhum estudo encontrado na literatura.

As frutanas são comumente encontradas em espécies da família Asteraceae (CHOQUE-DELGADO *et al.*, 2010), a qual a camomila pertence. Elas estão presentes como polímeros de reserva nas raízes tuberosas de espécies como a alcachofra-girasol (*Helianthus tuberosus*), a chicória (*Cichorium intybus*) e o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e podem ocorrer com uma ampla variação de sua massa molar

(APOLINÁRIO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015b; RITSEMA e SMEEKENS, 2003). Nas partes aéreas sua presença já foi relatada para algumas espécies, dentre elas a artemísia (*Artemisia vulgaris*), a estévia (*Stevia rebaudiana*), o agave-azul (*Agave tequilana*) e também para uma espécie pertencente ao mesmo gênero da camomila, o malmequer-das-praias (*Matricaria maritima*) (CÉRANTULA *et al.*, 2004; CORRÊA-FERREIRA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2011; PRAZNIK *et al.*, 2013).

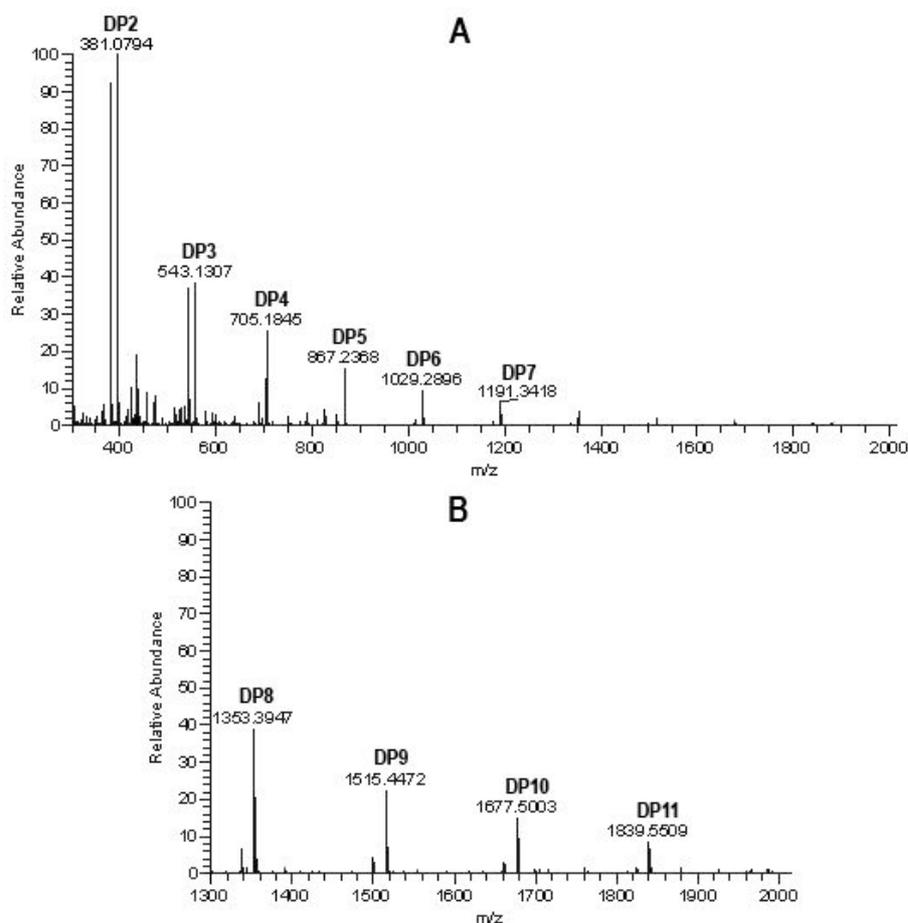


FIGURA 12. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA FRAÇÃO MRW-ET EM ESI-MS. PERFIL TOTAL (A) e ZOOM DE 10x NA REGIÃO DE 1300 A 2000 m/z (B).

Vários estudos já relataram e confirmaram o efeito prebiótico que frutanas do tipo inulina possuem, mostrando claramente o potencial deste polímero para a dieta humana (LI *et al.*, 2015b.; LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2005; ROBERFROID *et al.*, 1998; VAN DE WIELE *et al.*, 2007; VELAZQUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2014). O efeito prebiótico acontece quando moléculas utilizadas como ingrediente alimentar, resistem à digestão no estômago e intestino delgado e tornam-se disponíveis no cólon, onde são fermentados seletivamente por microrganismos benéficos, tais como bifidobactérias e lactobacilos, estimulando o seu crescimento e/ou atividades e assim melhorando a saúde do hospedeiro

(GIBSON e ROBERFROID, 1995). A eficácia desta atividade biológica é afetada pela distância que o polímero consegue percorrer no intestino, assim quanto maior a distância percorrida mais disponível para os microrganismos benéficos o polímero se tornará (LOO, 2004). Para frutanas e frutooligossacarídeos do tipo inulina a distância percorrida no intestino não depende apenas da dosagem na dieta, mas também do DP, sendo que quanto maior o DP maior será esta distância percorrida (LOO, 2004).

A partir dos rendimentos obtidos para as frações MRW-ET, SMRW-100E, SCE-30E e SCETE-10E (FIGURA 4) é possível observar que a presença de frutanas do tipo inulina acontece em alta quantidade no chá da camomila. Desta maneira é possível atribuir para camomila a atividade prebiótica, o que nunca antes havia sido relatado para esta espécie. Além disto, estas moléculas aparecem com um amplo grau de polimerização, sendo capazes de atingir uma grande distância no cólon, destacando o potencial do chá da camomila para o efeito prebiótico.

Em continuidade aos demais resultados, a fração SCE-30R apresentou na análise de composição monossacarídica principalmente ácidos urônicos e arabinose (TABELA 2). O espectro de ^{13}C -RMN desta fração (FIGURA 13A) apresentou principalmente os sinais atribuídos a homogalacturonana metil esterificada com grupamento acetil bem como sinais da frutana do tipo inulina, já observados na fração SMRW-100E, entretanto também foram observados sinais em δ 101,8 e δ 97,8 os quais poderiam corresponder aos carbonos anoméricos de unidades β -D-Xylp e α -D-GlcpA, respectivamente. Desta maneira na tentativa de purificar este polissacarídeo foi realizado o fracionamento pelo reagente de Fehling, pois conforme visto na literatura, as homogalacturonanas interagem com o cobre e precipitam, sendo assim separadas (CIPRIANI *et al.*, 2009). Este processo gerou duas frações, o precipitado denominado SCETE-PF com rendimento de 38,5% e o sobrenadante denominado SCETE-SF com rendimento de 37%.

A fração SCETE-PF apresentou no espectro de ^{13}C -RMN (FIGURA 13B) sinais em δ 99,0 (C1), δ 68,6 (C2) δ 69,3 (C3), δ 78,3 (C4), δ 71,5 (C5) e δ 175,0 (C6) atribuídos a unidades de $\rightarrow 1\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-}(-4\rightarrow$ (PERRONE *et al.*, 2002; VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009). Como previsto a fração SCETE-PF é composta pela homogalacturonana observada anteriormente, porém como a fração foi exposta a um meio alcalino forte, durante o tratamento com reagente de Fehling, ocorreu a desesterificação e desacetilação do polissacarídeo.

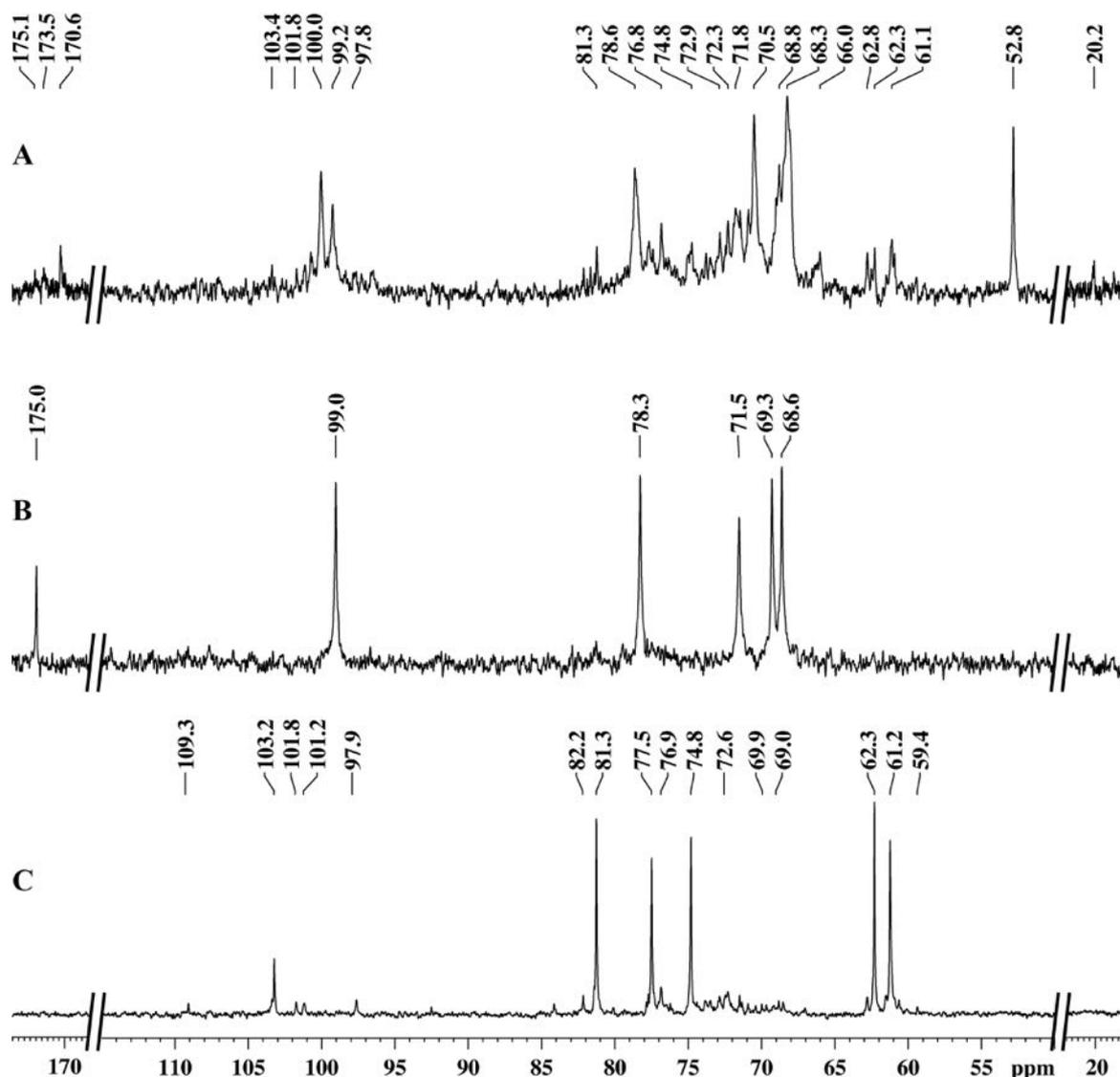


FIGURA 13. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES SCE-30R (A), SCETE-PF (B) E SCETE-SF (C) EM D_2O , A 70°C , COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

O espectro de ^{13}C -RMN da fração SCETE-SF (FIGURA 13C) apresentou além dos sinais observados na fração SCE-30R para a frutana do tipo inulina, ainda sinais em δ 101,2 e δ 101,8 atribuídos aos carbonos anoméricos de β -D-Xylp, em δ 97,9 (C1) e 59,4 (OCH₃) atribuídos a 4-O-Me- α -D-GlcpA, em δ 109,3 atribuído aos carbonos anoméricos de α -L-Araf e como previsto não apresentou os sinais referentes a homogalacturonana (VIGNON e GEY, 1998; WAGNER e JORDAN 1988). Com intuito de remover a frutana do tipo inulina, a fração SCETE-SF foi submetida ao tratamento enzimático com enzima do tipo *endo*-inulinase e deu origem a uma nova fração denominada CTSF-EN com rendimento de 42,8% (FIGURA 4).

A análise de composição monossacarídica da fração CTSF-EN apresentou principalmente arabinose e galactose, juntamente com menores proporções de xilose e

ácidos urônicos (TABELA 2). A partir desta análise observou-se que o tratamento com a enzima foi eficiente, pois reduziu o teor de frutose para apenas 8,2%. O espectro de ^{13}C -RMN desta fração (FIGURA 14) apresentou sinais em δ 109,0-107,0, δ 103,4, δ 101,1-101,7 e δ 97,6 atribuídos aos carbonos anoméricos de α -L-Araf, β -D-Galp-, β -D-Xylp e 4-O-Me- α -D-GlcpA respectivamente (VIGNON e GEY, 1998; WAGNER e JORDAN, 1988). A análise de homogeneidade por HPSEC da fração (FIGURA 15), apresentou perfil heterogêneo, demonstrando a presença de três grupos de moléculas com tamanhos distintos (3 picos).

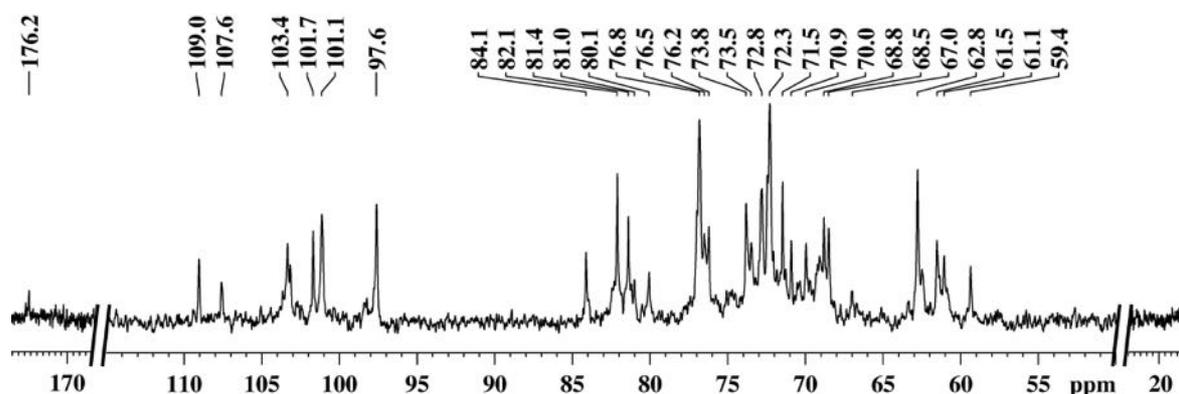


FIGURA 14. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DA FRAÇÃO CTSF-EN EM D_2O , A 50°C , COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

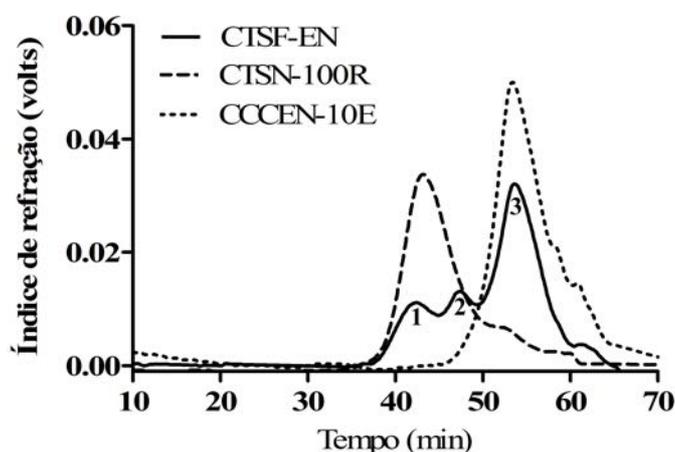


FIGURA 15. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO CTSF-EN, CTSN-100R e CCCEN-10E UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

Para continuar a purificação a fração CTSF-EN foi submetida ao processo de ultrafiltração sequencial em membranas de 100kDa, 50kDa e 10kDa. Este processo gerou as seguintes frações: retida em 100kDa denominada CTSN-100R com rendimento de 12,4%; retida em 50kDa denominada CTSNCE-50R com rendimento de 10,4%; retida em

10kDa denominada CCCEN-10R que não obteve rendimento suficiente para ser analisada e a eluída em 10kDa denominada CCCEN-10E com rendimento de 38,4% (FIGURA 4).

As frações CTSN-100R e CTSNCE-50R apresentaram resultados muito semelhantes, deste modo os resultados descritos para fração CTSN-100R equivalem para ambas frações. A análise de homogeneidade por HPSEC (FIGURA 15) para fração CTSN-100R apresentou um pico principal em torno de 42 min, provavelmente correspondendo ao pico 1 observado na análise de homogeneidade da fração CTSF-EN, mostrando que a ultrafiltração foi eficiente para concentrar esta molécula. A massa molar foi estimada em aproximadamente 640kDa. A fração CTSN-100R apresentou na análise de composição monossacarídica principalmente xilose e ácidos urônicos (TABELA 2). Devido a presença de ácidos urônicos a fração CTSN-100R foi carboxi-reduzida e submetida à análise de metilação, onde os principais derivados metilados obtidos foram: 2,3-Me₂-Xilitol, correspondente a unidades de xilose 4-*O*-substituídas, 3-Me-Xilitol, correspondente a unidades de xilose 2,4-di-*O*-substituídas e 2,3,4,6-Me₄-Glucitol, correspondente a unidades terminais de ácido glucurônico, demonstrando que o polissacarídeo é formado por uma cadeia principal composta por unidades de xilose (1→4)-ligadas e unidades xilose (1→4)-ligadas *O*-substituídas em *O*-2 por unidades de ácido 4-*O*-metil-glucurônico.

O espectro de ¹³C-RMN para fração CTSN-100R (FIGURA 16A) mostrou sinais em δ 101,7 (C1), δ 72,8 (C2), δ 73,8 (C3), δ 76,5 (C4) e δ 62,8 (C5) atribuídos a unidades de →4)-β-D-Xylp-(1→, em δ 101,2 (C1), δ 76,8 (C2), δ 72,1 (C3), δ 76,5 (C4) e 62,8 (C5) atribuídos a unidades de →2,4)-β-D-Xylp-(1→ e em δ 97,6 (C1), δ 71,5 (C2), δ 72,3 (C3), δ 82,1 (C4), δ 72,5 (C5) e δ 176, 3 (C6) atribuídos a unidades de 4-*O*-Me-α-D-GlcpA-(1→ (VIGNON e GEY, 1998). Em acréscimo foi realizado a análise de HSQC (FIGURA 17) e os assinalamentos, organizados na tabela 3, foram determinados por análise de COSY e TOCSY.

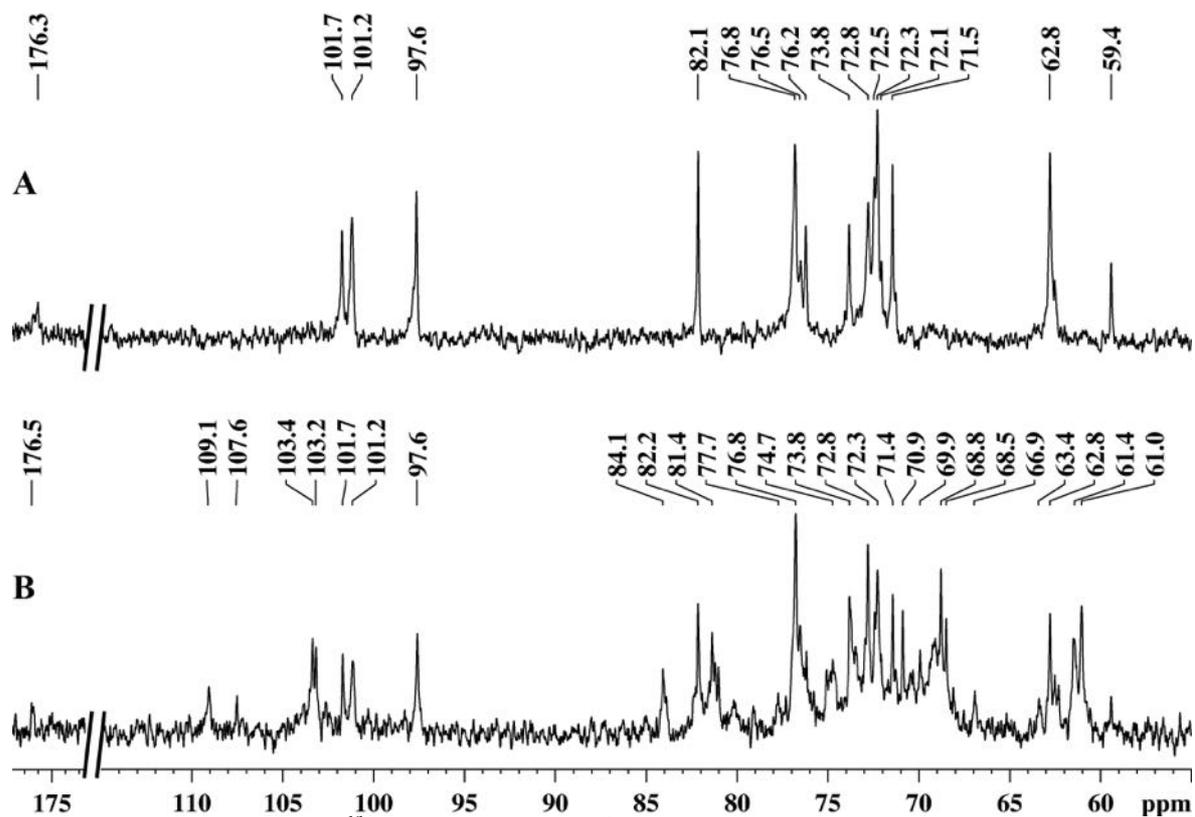


FIGURA 16. ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DAS FRAÇÕES CTSN-100R (A) E CCCN-10E (B) EM D_2O , A 50°C , COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

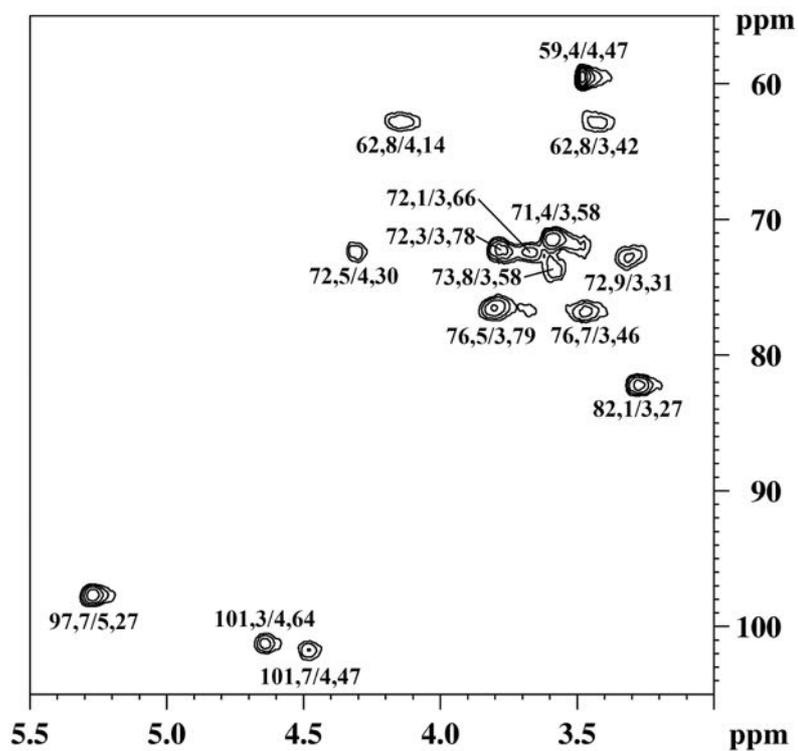


FIGURA 17. ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO CTSN-100R EM D_2O , A 50°C COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

TABELA 2 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C (δ) EXPRESSOS EM PPM DA 4-*O*-METIL-GLUCURONOXILANA PRESENTE NA FRACÇÃO CTSN-100R.

| Unidades | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | -OCH ₃ |
|-------------------------------|---|-------|-------------------------|------|-------------------------|--------------|-------|-------------------|
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | C | 101,7 | 72,9 | 73,8 | 76,5^a | 62,8 | - | - |
| | H | 4,47 | 3,31 | 3,58 | 3,79 | 3,42 4,14 | - | - |
| →2,4)-β-D-Xylp-(1→ | C | 101,3 | 76,7^a | 72,1 | 76,5^a | 62,8 | - | - |
| | H | 4,64 | 3,46 | 3,66 | 3,79 | 3,42 4,14 | - | - |
| 4- <i>O</i> -Me-α-D-GlcpA-(1→ | C | 97,7 | 71,4 | 72,3 | 82,1^a | 72,5 | 176,3 | 59,4 |
| | H | 5,27 | 3,58 | 3,78 | 3,27 | 4,30 | - | 4,47 |

NOTAS: (a) Indica o carbono *O*-substituído

Com base nas análises realizadas, é possível afirmar que a fração CTSN-100R é composta por uma 4-*O*-metil-glucuronoxilana, que consiste em uma cadeia principal composta por unidades de xilose (1→4)-ligadas e xilose (1→4)-ligadas substituídas em *O*-2 por unidades de ácido 4-*O*-metil-glucurônico.

Wagner e colaboradores (1984) e Füller e Franz (1993) já haviam observado a presença de uma 4-*O*-metil-glucuronoxilana nos extratos da camomila, porém as outras características químicas observadas no presente trabalho não foram relatadas. Pode ser observado, entretanto, que os rendimentos obtidos por esses autores, que foi de 0,5% (baseado no peso seco), está muito acima aos daqui obtidos (abaixo de 0,1%).

Dentro da família Asteraceae, a presença de uma 4-*O*-metil-glucuronoxilana já foi observada para a rubéquia (*Rudbeckia fulgida*), sendo que a quantidade de ácido glucurônico observada foi 12%, inferior a obtida neste trabalho (KARDOŠOVÁ, *et al.*, 1998). Glucuronoxilanas compostas exclusivamente por unidades de xilose (1→4)-ligadas e xilose (1→4)-ligadas substituídas em *O*-2 por unidades de ácido 4-*O*-metil-glucurônico já foram também relatadas para vegetais de outras famílias, tais como kenaf (*Hibiscus cannabinus*), uva de oregon (*Mahonia aquifolium*), bucha (*Luffa cylindrica*), juta (*Corchorus capsularis*) e marmeleiro (*Cydonia oblonga*), nos polissacarídeos observados para estas espécies houve uma variação de 4% a 20% na quantidade de ácido glucurônico (KARDOŠOVÁ *et al.*, 2002; NACOS *et al.*, 2006; VIGNON e GEY, 1998).

A fração CCCEN-10E, mesmo sendo a última proveniente da ultrafiltração sequencial, apresentou no espectro de ^{13}C -RMN (FIGURA 16B) os sinais já observados para fração original (CTSF-EN) em δ 109,0-107,0, δ 103,4, δ 101,1-101,7 e δ 97,6 atribuídos aos carbonos anoméricos de α -L-Araf, β -D-Galp-, β -D-Xylp e 4-O-Me- α -D-GlcpA respectivamente (VIGNON e GEY, 1998; WAGNER e JORDAN, 1988). A análise de homogeneidade por HPSEC desta fração (FIGURA 15), apresentou um pico único em torno de 54 min, provavelmente correspondendo ao pico 3 observado na análise de homogeneidade da fração CTSF-EN. A massa molar foi estimada em aproximadamente 10kDa.

Pelo perfil de homogeneidade da fração CCCEN-10E foi possível visualizar que os polissacarídeos presentes na fração apresentam massas molares similares e desta maneira a ultrafiltração não seria um processo eficiente para separar estas moléculas. Uma vez que a 4-O-metil-glucuronoxilana, presente na fração, apresenta um alto conteúdo de ácido glucurônico, utilizou-se a cromatografia de troca iônica como estratégia para purificação. O processo gerou duas novas frações, a retida na coluna denominada CCCEDE-RDEAE que não foi recuperada, por já conhecermos a molécula presente e a eluída da coluna denominada CCCEDE-EDEAE com rendimento de 30,2%.

A fração CCCEDE-EDEAE apresentou na análise de composição monossacarídica principalmente arabinose e galactose. A fração carboxireduzida foi metilada e analisada (TABELA 4). O principal derivado encontrado foi o 2,4-Me₂-galactitol acetato, correspondente a unidades de galactose 3,6-di-O-substituídas. Outros derivados da galactose observados foram 2,3,4,6-Me₄-galactitol acetato, 2,3,4-Me₃-galactitol acetato, 2,4,6-Me₃-galactitol acetato e 4-Me-galactitol acetato, correspondentes a unidades de galactose terminal, 6-O-, 3-O- e 2,3,6-tri-O-substituídas, respectivamente. Os derivados de arabinose foram: 2,3,5-Me₃-arabinitol, correspondente a unidades α -L-Araf-(1 \rightarrow); 2,3-Me₂-arabinitol, correspondente a unidades \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow e 2-Me-arabinitol correspondente a unidades \rightarrow 3,5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow . O derivado 2,3,4,6-Me₄-Glucitol também foi observado e corresponde a unidades de GlcpA-(1 \rightarrow . Desta maneira, pode-se observar pela análise de metilação, que a fração CCCEDE-EDEAE contém uma arabinogalactana do tipo II, na qual a cadeia principal é formada por unidades de galactose (1 \rightarrow 3) ligadas, O-6 substituídas por cadeias laterais.

A fração CCCEDE-EDEAE também foi analisada por HSQC com DEPT (FIGURA 18). Na região anomérica podem ser vistos os sinais em δ 109,0/5,24, δ 107,3/5,07, δ

103,8/4,69, δ 103,2/4,46 e δ 103,0/4,51, os quais podem ser atribuídos aos C1/H1 das unidades de α -L-Araf-(1 \rightarrow , \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow , β -D-Galp-(1 \rightarrow , \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow / \rightarrow 3,6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow e \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow , respectivamente. Sinais invertidos e deslocados para campo baixo podem ser vistos em: a) δ 69,2/4,04 e δ 69,2/3,92, os quais podem ser atribuídos ao C-6 substituídos das unidades de β -D-Galp e; b) δ 66,6/3,80 e δ 66,6/3,87, atribuídos ao C-5 substituídos das unidades de α -L-Araf. Sinais invertidos também estão presentes em δ 61,2/3,80, δ 61,1/3,73 e δ 60,9/3,77, os quais podem ser atribuídos ao C-6 e C-5 livres das unidades de α -L-Araf-(1 \rightarrow , β -D-Galp-(1 \rightarrow e \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow . Apesar de ser verificada a presença de aproximadamente 6% de ácido glucurônico na fração, nenhum sinal foi observado no espectro de HSQC. Os assinalamentos foram realizados com base em dados obtidos a partir da literatura e pode-se verificar que estão de acordo com os dados de metilação discutidos acima (BRECKER, *et al.*, 2005; CAPEK, *et al.*, 2010; DONG e FANG, 2001; GOELLNER, *et al.*, 2011; LIANG, *et al.*, 2014; WANG, *et al.*, 2015a; WANG, *et al.*, 2015b).

TABELA 3 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DA ARABINOGALACTANA DO TIPO II PRESENTE NA FRAÇÃO CCCUDE-EDEAE.

| Derivados <i>O</i> -metilados | mol % | |
|----------------------------------|--|---------------------------|
| | Ligações | CCCEDE-EDEAE ^a |
| 2,3,5-Me ₃ -Araf | Araf-(1 \rightarrow | 11,5 |
| 2,3,4,6-Me ₄ -GlcP | GlcP-(1 \rightarrow | 7,2 |
| 2,3,4,6-Me ₄ -Galp | Galp-(1 \rightarrow | 14,9 |
| 2,3-Me ₂ -Araf | \rightarrow 5)-Araf-(1 \rightarrow | 8,8 |
| 2-Me-Araf | \rightarrow 3,5)-Araf-(1 \rightarrow | 1,1 |
| 2,4,6-Me ₃ -Galp | \rightarrow 3)-Galp-(1 \rightarrow | 2,3 |
| 2,3,4-Me ₃ -Galp | \rightarrow 6)-Galp-(1 \rightarrow | 4,1 |
| 2,4-Me ₂ -Galp | \rightarrow 3,6)-Galp-(1 \rightarrow | 45,2 |
| 4-Me-Galp | \rightarrow 2,3,6)-Galp-(1 \rightarrow | 4,9 |

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados por GC-MS.
(a) Fração previamente carboxi-reduzida pelo método de Taylor e Conrad (1972).

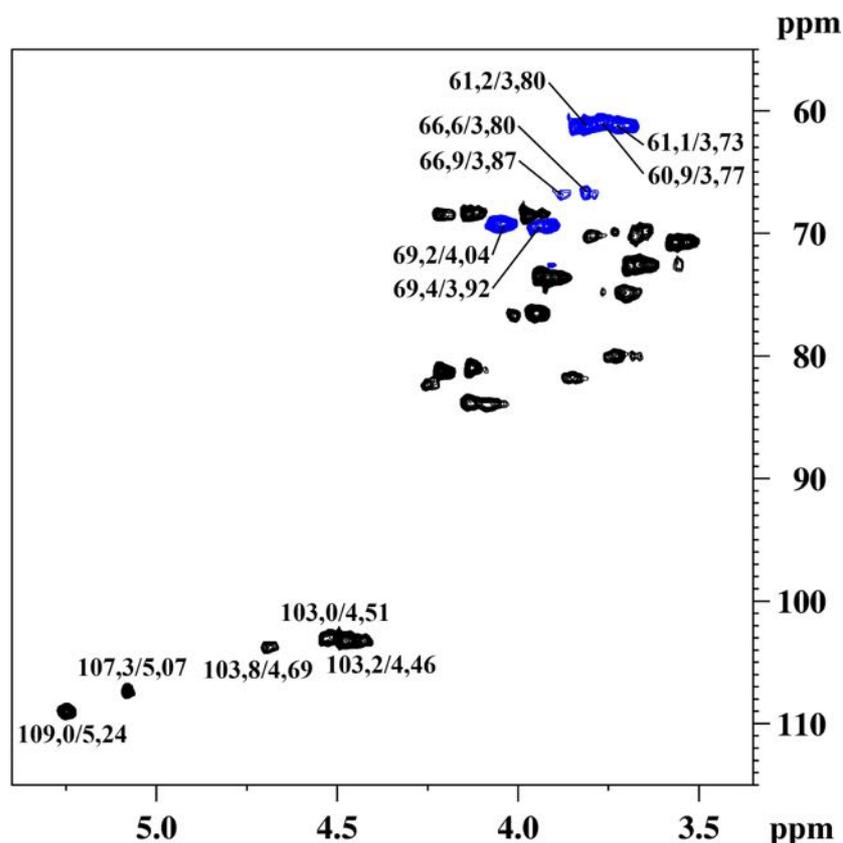


FIGURA 18. ESPECTRO DE HSQC/DEPT DA FRAÇÃO CCCEDE-EDEAE EM D₂O, A 50 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM. OS SINAIS EM AZUL INVERTERAM NESTE EXPERIMENTO.

Füller e Franz (1993) também haviam observado a presença de uma arabinogalactana nos extratos da camomila, porém as demais características, observadas no presente trabalho, não foram relatadas.

As arabinogalactanas do tipo II apresentam uma estrutura geral semelhante, porém ocorre uma alta variação da estrutura química fina entre as espécies vegetais (CARPITA e GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM *et al.*, 1996). Na literatura, o único relato encontrado de arabinogalactanas do tipo II presente em flores de espécies da família Asteraceae, foi para o crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) (LIANG, *et al.*, 2014).

5.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS

5.2.1 Atividade antinociceptiva

O infuso (chá) de camomila (*Chamomilla recutita*) possui entre suas indicações populares os usos em quadros de dores abdominais (cólica) e principalmente quadros inflamatórios. Esses efeitos são, geralmente, atribuídos aos compostos secundários presentes, porém para os polissacarídeos da camomila ambos os efeitos são pouco explorados. É sabido que frações polissacarídicas isoladas de vegetais, tais como galactoarabinoglucuronoxilanas, arabinogalactanas, polissacarídeos sulfatados e frações brutas podem apresentar tais atividades biológicas (NASCIMENTO *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2012b; YE *et al.*, 2013). Deste modo optou-se por avaliar a propriedade antinociceptiva das frações polissacarídicas extraídas da camomila.

As frações SMRW-100R, SCETE-10E e CTSN-100R foram escolhidas, pois apresentam diferentes polissacarídeos, a saber, a homogalaturonana, a frutana e a 4-*O*-metil-glucuronoxilana, respectivamente. O modelo biológico empregado foi o de nocicepção induzida por formalina em camundongos. Neste modelo, dois parâmetros são estabelecidos, o primeiro (fase I) avalia a nocicepção de origem neurogênica, que consiste na ação direta da formalina nos nociceptores e o segundo (fase II) avalia a nocicepção de origem inflamatória, que consiste na ativação de nociceptores polimodais e liberação de mediadores pró-inflamatórios (RODRIGUES *et al.*, 2012a).

Os resultados obtidos com a administração intraperitoneal das frações SMRW-100R e SCETE-10E mostram que as frações não tiveram diferença significativa do controle nas doses testadas, portanto não inibem a resposta nociceptiva induzida pela formalina em nenhuma das fases (FIGURA 19 e 20).

Por outro lado, os resultados mostram que a fração CTSN-100R obteve diferença significativa nas duas fases quando comparadas aos controles, obtendo uma diminuição na nocicepção de aproximadamente 71% para a dose de 10 mg/kg e 81% para a dose de 30 mg/kg na fase aguda (Fase I) e 59% para a dose de 10 mg/kg e 96% para dose de 30 mg/kg na fase inflamatória (Fase II) (FIGURA 21). Entretanto, foi observado através da análise estatística que na fase aguda não houve diferença significativa entre as doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg. Este resultado mostra ação antinociceptiva para a fração, porém ao decorrer do

experimento foram observados alguns sintomas nos animais, como sonolência e pelos ouriçados, indicando que o polissacarídeo poderia estar interferindo no sistema nervoso dos animais. Para verificar essa evidência o teste de campo aberto foi empregado.

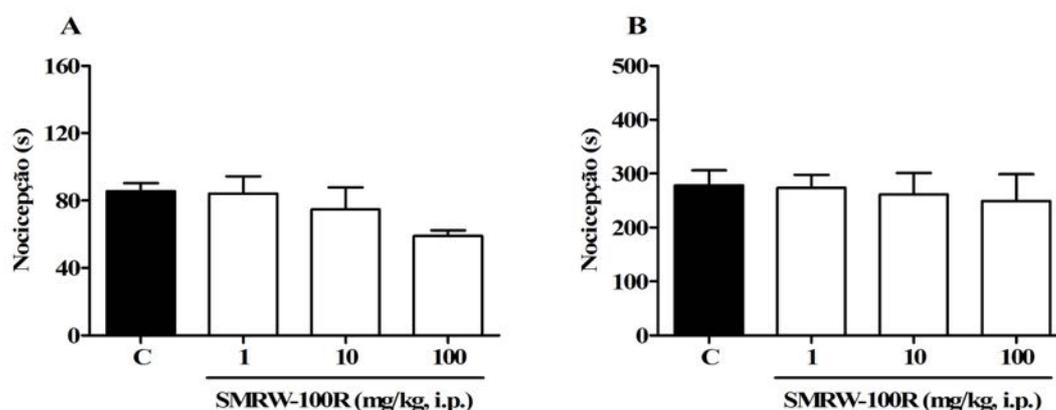


FIGURA 19. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO SMRW-100R NA FASE NEUROGÊNICA (A) E FASE INFLAMATÓRIA (B) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com veículo (C - controle, 10 mL/kg, i.p.) ou doses da fração SMRW-100R (1, 10 e 100 mg/kg, i.p.).

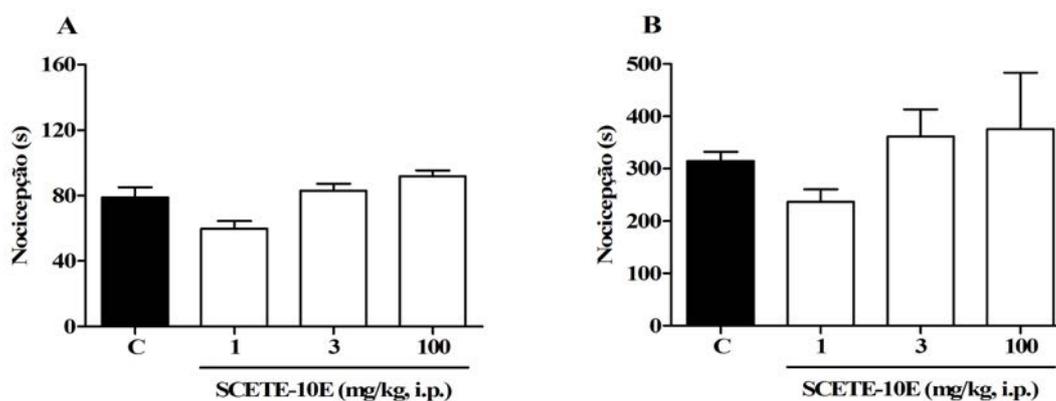


FIGURA 20. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO SCETE-10E NA FASE NEUROGÊNICA (A) E FASE INFLAMATÓRIA (B) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com veículo (C - controle, 10 mL/kg, i.p.) ou doses da fração SCETE-10E (1, 3 e 100 mg/kg, i.p.).

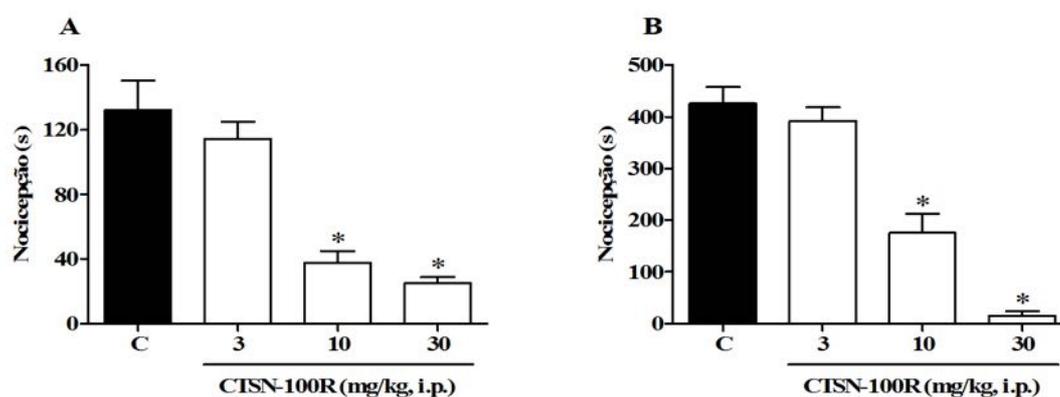


FIGURA 21. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO CTSN-100R NA FASE NEUROGÊNICA (A) E FASE INFLAMATÓRIA (B) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com veículo (C - controle, 10 mL/kg, i.p.) ou doses da fração CTSN-100R (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.).

O teste de campo aberto para CTSN-100R mostrou que a fração afeta o sistema locomotor quando comparada ao controle, diminuindo a locomoção em 65% para a dose de 10 mg/kg e 80% para dose de 30 mg/kg (FIGURA 22). Além disso, através da análise estatística foi observado que os grupos tratados (10 e 30 mg/kg) não apresentaram diferença significativa entre si. Este resultado indica que a fração pode ter obtido um falso resultado positivo no modelo de avaliação antinociceptiva e que o real efeito pode ser uma ação sedativa no sistema nervoso dos animais, porém outros experimentos são necessários para confirmar esta informação.

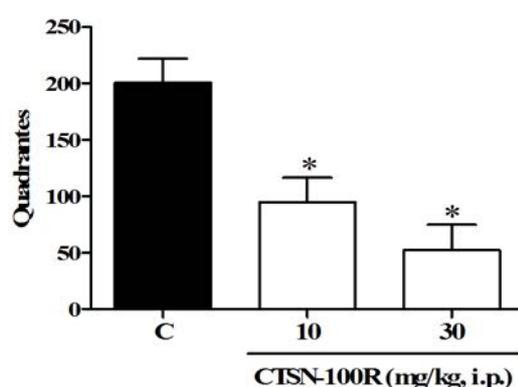


FIGURA 22. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO CTSN-100R NA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com veículo (C - controle, 10 mL/kg, i.p.) ou doses da fração CTSN-100R (10 e 30 mg/kg, i.p.).

A atividade antinociceptiva já foi observada anteriormente para a camomila e foi atribuída a substância α -bisabolol encontrada na espécie, e que também atua como anti-

inflamatório (LEITE *et al.*, 2011). Acreditava-se que a atividade sedativa dos extratos brutos da camomila acontecia pela presença do flavonóide apigenina, porém um estudo realizado por Avallone e colaboradores (2000) mostrou que este composto, isolado a partir da espécie, não apresenta tal atividade. Desta maneira é possível sugerir que glucuronoxilana presente na fração CTSN-100R, está de algum modo conectada a estas atividades.

5.2.2 Atividade antiúlcera gástrica

Não há relatos de que a camomila seja utilizada popularmente contra úlcera gástrica, porém é sabido que os polissacarídeos de origem vegetal podem apresentar significativa ação antiúlcera gástrica. Entre os polissacarídeos que apresentam bons resultados para esta atividade biológica estão as glucofrutanas (MALAFAIA *et al.*, 2015), glucuronoarabinoxilanas (SIMAS-TOSIN *et al.*, 2014), heteroxilanas ácidas (CIPRIANI *et al.*, 2008) e homogalacturonanas (CIPRIANI *et al.*, 2009). Estes polissacarídeos se assemelham com os encontrados no infuso (chá) da camomila, assim para investigar se os polissacarídeos presentes promovem a ação antiúlcera a fração bruta de polissacarídeos (MRW) foi submetida a avaliação de atividade no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

O método consiste na verificação da proteção que os polissacarídeos proporcionam contra lesões gástricas (induzidas por etanol) em ratos, baseado na área da lesão observada no estômago dos animais (ROBERT *et al.*, 1979). O resultado obtido demonstrou que a administração oral de MRW, 1 h antes da indução de lesões gástricas, resultou em redução da área lesionada em 91% na dose de 3 mg/kg e 64% na dose de 10 mg/kg quando comparadas ao grupo controle tratado com veículo (Figura 24A e B) e ainda que esta redução foi menor que a observada para o controle positivo tratado com omeprazol (40 mg/kg). Além disso, através da análise estatística foi observado que os grupos que receberam as doses de 3 e 10 mg/kg de MRW não apresentaram diferença significativa entre si (FIGURA 23).

A fração bruta de polissacarídeos (MRW) demonstrou possuir atividade gastroprotetora nas concentrações de 3 e 10 mg/kg, prevenindo a formação de lesões agudas causadas por administração de etanol. Esta ação pode acontecer devido; a habilidade destes polímeros de se ligar à superfície da mucosa gástrica, funcionando como

uma camada protetora; a diminuição da secreção de suco gástrico; a proteção da mucosa pelo aumento da síntese de muco e/ou o sequestro de radicais livres, porém outros estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação presente (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2011; NERGARD *et al.*, 2005; YAMADA, 1994).

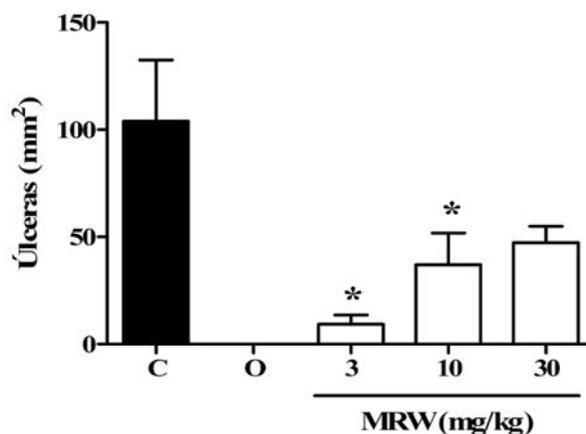


FIGURA 23. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DA FRAÇÃO MRW (3, 10 E 30 mg/kg) CONTRA LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS (C: CONTROLE, ÁGUA 0,1 mL/100 g; O: OMEPRAZOL 40 mg/kg).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o infuso de camomila (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) apresenta 3,2% de polissacarídeos estruturais e de reserva, sendo caracterizados 4 polissacarídeos distintos. Uma homogalacturonana linear composta por unidades de $\rightarrow 1$)- α -D-GalpA-(4 \rightarrow altamente metil esterificada (DE 87%) e acetilada (DA 19%), com massa molar estimada em 570kDa; uma frutana linear do tipo inulina composta por unidades de $\rightarrow 1$)- β -D-Frucf-(2 \rightarrow ; uma 4-O-metil-glucuronoxilana composta por uma cadeia principal formada por unidades de $\rightarrow 4$)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow e unidades $\rightarrow 2,4$)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow substituídas por unidades de ácido 4-O-Me- α -D-GlcpA-(1 \rightarrow , com massa molar estimada em 640kDa e uma arabinogalactana do tipo II. Além disto foi observada a presença frutooligosacarídeos com grau de polimerização que varia de 2 a 11 unidades.

Através dos experimentos de atividade biológica conclui-se que as frações compostas pela homogalacturonana e pela frutana não inibem a resposta nociceptiva induzida pela formalina em nenhuma das fases. Já a fração composta pela 4-O-metil-glucuronoxilana inibe a resposta nociceptiva nas doses de 10 e 30 mg/kg em ambas as fases, porém devido a fração diminuir a locomoção no teste de campo aberto o efeito pode estar resultando de uma atividade sedativa do sistema nervoso do animal. Também a fração bruta dos polissacarídeos (MRW) apresenta ação antiúlcera gástrica nas doses de 3 e 10 mg/kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.

REFERÊNCIAS

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v. 28, p. 13-19, 1993.

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. *Progress in biotechnology: Pectins and Pectinases*, v. 14, p. 47-55, 1996.

ALIBABAEI, Z.; RABIEI, Z.; RAHNAMA, S.; MOKHTARI, S.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. *Matricaria Chamomilla* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, p. 355-360, 2014.

AMIRGHOFNAN, Z.; AZADBAKHT, M.; KARIMI, M. H. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 167-172, 2000.

AN, N. T.; THIEN, D. T.; DONG, N. T.; DUNG, P. L.; DU V. N. Isolation and characteristics of polysaccharide from *Amorphophallus corrugatus* in Vietnam. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 64-68, 2011.

APOLINÁRIO, A. C.; DAMASCENO, B. P. G. L.; BELTRÃO, N. E. M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J. A. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, 101, 368-378, 2014.

ASPINALL, G. O. Gums and mucilages. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 24, p. 333-79, 1969.

ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. *Carbohydrates: structure and function. A comprehensive treatise. The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press, v.3, p. 473-500, 1980.

AUSTARHEIM, I.; MAHAMANE, H.; SANOGO, R.; TOGOLA, A.; KHALEDABADI, M.; VESTRHEIM, A. C.; INNGJERDINGEN, K. T.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Anti-ulcer polysaccharides from *Cola cordifolia* bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 221-227, 2012.

AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUIA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1387-1394, 2000.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 143-204, 1997.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: Source of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p.1154-1160, 1985.

BRASIL, Ministério Da Saúde. **Programa Nacional De Plantas Medicinai s E Fitoterápicos**. Brasília: Editora MS, 135p, 2009.

BRECKER, L.; WICKLEIN, D.; MOLL, H.; FUCHS, E. C.; BECKER, W. M.; PETERSEN, A. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pratense* L.). **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 657-663, 2005.

BRETT, C. T.; WALDRON, K. W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. 2 ed. London: Chapman and Hall, 256p, 1996.

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017-1023, 2010.

CAFFALL K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879-1900, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phototherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CANTU-JUNGLES, T. M.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. (2014). Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food Chemistry**, v. 146, p. 492-499, 2014.

CAO, L.; LIU, X.; QIAN, T.; SUN, G.; GUO, Y.; CHANG, F.; ZHOU, S.; SUN, X. Antitumor and immunomodulatory activity of arabinoxylans: A major constituent of wheat bran. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 160-164, 2011.

CAPEK, P.; MATULOVÁ, M.; NAVARINI, L.; SUGGI-LIVERANI, F. Structural features of an arabinogalactan-protein isolated from instant coffee powder of *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 180-185, 2010.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Wiley. p 52-109, 2002.

CÉRANTOLA, S.; KERVAREC, N.; PICHON, R.; MAGNÉ, C.; BESSIERES, M. A.; DESLANDES, E. NMR characterisation of inulin-type fructooligosaccharides as the major

water-soluble carbohydrates from *Matricaria maritima* (L.). **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2445-2449, 2004.

CHANDRASHEKHAR, V. M.; HALAGALI, K. S.; NIDAVANI, R. B.; SHALAVADI, M. H.; BIRADAR, B. S.; BISWAS, D.; MUCHCHANDI, I. S. Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 336-340, 2011.

CHATTOPADHYAY, N.; NOSÁL'OVÁ, G.; SAHA, S.; BANDYOPADHYAY, S. S.; FLEŠKOVÁ, D.; RAY, B. Structural features and antitussive activity of water extracted polysaccharide from *Adhatoda vasica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1970-1974, 2011.

CHESSON, A. Dietary Fiber. In: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food polysaccharides and their applications**. 2ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 629-664, 2006.

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

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.; MELLINGER, C. G.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 274-278, 2008.

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

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.

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

CORRÊA-FERREIRA, M. L.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O. *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*: A comparative study of infusion polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 738-745, 2014.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, C. L.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais condimentares e aromáticas**. Curitiba: Emater Paraná, 162p. 1991.

CORRÊA JUNIOR, C.; TANIGUCHI, E. Aspectos da cultura de camomila no Estado do Paraná. Aracajú: **Horticultura Brasileira**, v. 10, n.1, p.52, 1992.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

CRONQUIST, A. **The Evolution And Classification Of Flowering Plants**. New York: The New York Botanical Garden, 555p, 1988.

CUI, Y.; RONG, C.; WANG, J.; CUI, C.; WANG, L.; FENG, Z.; FENG, J.; NIU, B. Mechanism-based anti-anxiety effects of polysaccharides extracted from Shudihuang (*Radix Rehmanniae Preparata*) by two-dimensional electrophoresis analysis in rat hippocampus proteins. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 33(4), p. 524-530, 2013.

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

DI, H.; ZHANG, Y.; CHEN, D. An anti-complementary polysaccharide from the roots of *Bupleurum chinense*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 179-185, 2013.

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

DUARTE, C. M. E.; QUIRINO, M. R. S.; PATROCÍNIO, M. C.; ANBINDER, A. L. Effects of *Chamomilla recutita* (L.) on oral wound healing in rats. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 16, n. 6, p. 716-721, 2011.

FACCIN-GALHARDI, L. C.; YAMAMOTO, K. A.; RAY, S.; RAY, B.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 86-90, 2012.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without Interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157-162, 1991.

FRANKE, R. **Chamomile Industrial Profiles**. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 278p, 2005.

FÜLLER, E.; FRANZ, G. Neues von den kamillenpolysacchariden. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 133, p. 4224-4227. 1993.

FÜLLER E.; SOSA S., TUBARO A.; FRANZ G.; DELLA-LOGGIA R. Anti-inflammatory activity of chamomilla polysaccharides. **Planta Medica**, v. 59, p. 666-667, 1993.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GOELLNER, E. M.; UTERMOEHLEN, J.; KRAMER, R.; CLASSEN, B. Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1739-1744, 2011.

GORIN, A. C.; YAKOVLEV, A. I. Petic acid from the polysaccharide complex of the flowers of *Matricaria chamomilla*. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii**, n. 4, p. 515-516, 1971.

GORIN, A. C.; YAKOVLEV, A. I. Polysaccharides of *Matricaria chamomilla*: monosaccharide composition of the polysaccharide complex. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii**, n. 2, p. 137-141, 1974.

GORIN, A. C.; YAKOVLEV, A. I. Structure of the petic acid of *Matricaria chamomilla*. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii**, n. 2, p. 186-189, 1977.

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

GRASDALEN, H.; BAKØI, O. E.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 183-191, 1988.

GUPTA R. K.; KUMAR D.; CHAUDHARY A. K.; MAITHANI M.; SINGH R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 801-806, 2012.

HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Chemistry and molecular organization of plant cell walls. In: Himmel M. E. **Biomass Recalcitrance: Deconstructing The Plant Cell Wall For Bioenergy**. Oxford: Blackwell Publishing, p. 61-93, 2008.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. Inulina e oligofrutosos: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, 2002.

HENDRY G. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. **New Phytologist**, v. 106, p. 201-216, 1987.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivate with hydroxylamine, and its analytical application. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p. 249-261, 1949.

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

JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, 203-210, 2001.

KALVATCHEV Z.; WALDER R.; GARZARO D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 176-180, 1997.

KARDOŠOVÁ, A.; MALOVÍKOVÁ, A.; PÄTOPRSTÝ, V.; NOSÁL'OVÁ, G.; MATÁKOVÁ, T. Structural characterization and antitussive activity of a glucuronoxylan from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 27-33, 2002.

KARDOŠOVÁ, A.; MATULOVÁ, M.; MALOVÍKOVÁ, A.; (4-*O*-Methyl- α -D-glucurono)-D-xylan from *Rudbeckia fulgida*, var. *sullivantii* (Boynton et Beadle). **Carbohydrate Research**, v. 308, p. 99-105, 1998.

LEITE, G. O.; LEITE, L. H. I.; SAMPAIO, R. S.; ARARUNA, M. K. A.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R. (-)- α -Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia**, v. 82, p. 208-211, 2011.

LI, W.; ZHANG, J.; YU, C.; LI, Q.; DONG, F.; WANG, G.; GU, G.; GUO, Z. Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 315-319, 2015b.

LI, Y. J.; LIN, D. D.; JIAO, B.; XU, C. T.; QIN, J. K.; YE, G. J.; SU, G. F. Purification, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharide from *Cissus pteroclada* Hayata. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 307-313, 2015a.

LIANG, F.; HU, C.; HE, Z.; PAN, Y. An arabinogalactan from flowers of *Chrysanthemum morifolium*: structural and bioactivity studies. **Carbohydrate Research**, v. 387, p. 37-41, 2014.

LIU, J.; WILLFÖR, S.; XUN, C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrate and Dietary Fibre**, v. 5, p. 31-61, 2015.

LIU, J.; ZHANG, L.; REN, Y.; GAO, Y.; KANG, L.; QIAO, Q. Anticancer and immunoregulatory activity of *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 1-4, 2014.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOGGIA, R. D.; TRAVERSA, U.; SCARCIA, V.; TUBARO, A. Depressive effects of *Chamomilla recutita* (L.) Rausch, tubular flowers, on central nervous system in mice. **Pharmacological Research Communications**, v. 14, n. 2, p. 153-162, 1982

LÓPEZ-MOLINA, D.; NAVARRO-MARTÍNEZ, M. D.; MELGAREJO, F. R.; HINER, A. N. P.; CHAZARRA, S.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.) **Phytochemistry**, v. 66, p. 1476-1484, 2005.

LOO, J. V. The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 89-98, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais Do Brasil Nativas E Exóticas**. 2ed. Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum, 544p, 2008.

MALAFAIA, C. R. A.; SILVA, B. P.; TINOCO, L. W.; PARENTE, J. P. Structural characterization and gastroprotective property of a novel glucofructan from *Allium ampeloprasum* var. *porrum*. **Carbohydrate Research**, v. 402, p. 44-49, 2015.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 374, p. 1449-1461, 2009.

MARIA-FERREIRA, D.; DARTORA, N.; SILVA, L. M.; PEREIRA, I. T.; SOUZA, L. M.; RITTER, D. S.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F. P.; SASSAKI, G. L.; BAGGIO, C. H. Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 125-133, 2013.

MELLINGER-SILVA, C.; SIMAS-TOSIN, F. F.; SCHIAVINI, D. N.; WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; DA SILVA, L. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Isolation of a gastroprotective arabinoxylan from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10524-10528, 2011.

MOLINA D. L.; MARTÍNEZ, M. D. N.; MELGAREJO, F. R.; HINER, A. N. P.; CHAZARRA, S.; LÓPEZ, J. N. R. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Phytochemistry**, v. 66, p. 1476-1484, 2005.

MOON, T.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 16, p. 9-14, 2006.

NACOS, M. K.; KATAPODIS, P.; PAPPAS, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; CHRISTAKOPOULOS, P.; POLISSIOU, M. Kenaf xylan - A source of biologically active acidic oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 126-134, 2006.

NASCIMENTO, A. M.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, 2012.

NASCIMENTO, G. E.; HAMM, L. A.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structure of a galactoarabinoglucuronoxylan from tamarillo (*Solanum betaceum*), a tropical exotic fruit, and its biological activity. **Food Chemistry**, v. 141, p. 510-516, 2013.

NASCIMENTO, G. E.; CORSO, C. R.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 300-306, 2015.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: Antiulcer, radical scavenging and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.

NI, W.; GAO, T.; WANG, H.; DU, Y.; LI, J.; LI, C.; WEI, L.; BI, H. Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 529-535, 2013.

ODY, P. **The Complete Medicinal Herbal**. New York: Dorling Kindersley, 192p, 1993.

OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, R. A. C.; CHIERRITO, T. P. C. SANTOS, M. M., SOUZA, L. M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Food Chemistry**, v. 129, p. 305-311, 2011.

PARENTE, J. P.; ADÃO, C. R.; SILVA, B. P.; TINOCO, L. W. Structural characterization of an acetylated glucomannan with antiinflammatory activity and gastroprotective property from *Cyrtopodium andersonii*. **Carbohydrate Research**, v. 391, p. 16-21, 2014.

PERRONE, P.; HEWAGE, C. M.; THOMSON, A. R.; BAILEY, K; SADLER, I. H.; FRY, S. C. Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. **Phytochemistry**, v. 60, p. 67-77, 2002.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plant's usage. **Pharmacognosy Review**, v. 6, n. 11, 1-5, 2012.

POLLOCK, C. J.; CHATTERTON, N.J. Fructans. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. Carbohydrates. A comprehensive treatise. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, v. 14, p. 109-140, 1988.

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOVA, G. Y.; VIATYASEV, F. V.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, v. 124, p. 309-315, 2011.

PRAZNIK, W.; LÖPPERT, R.; RUBIO, J. M. C.; ZANGGER, K.; HUBER, A. Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* Weber, var. azul. **Carbohydrate Research**, v. 381, p. 64-73, 2013.

QU, H. M.; LIU, S. J.; ZHANG, C. Y. Antitumor and antiangiogenic activity of *Schisandra chinensis* polysaccharide in a renal cell carcinoma model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 52-56, 2014.

RAMBERG, J. E.; NELSON, E. D.; SINNOTT, R. A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 54, p. 1-22, 2010.

RAO, R. S. P.; ANDERSEN, J. R.; DIONISIO, G.; BOELT, B. Fructan accumulation and transcription of candidate genes during cold acclimation in three varieties of *Poa pratensis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 344-351, 2011.

RAUSCHERT, S. Nomenklatorische Probleme in der Gattung *Matricaria* L., **Folia Geobotanica Phytotaxonomica**, v. 9, p. 249-260, 1990.

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

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

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

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J. A. E.; GIBSON, G. R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 11-19, 1998.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433, 1979.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A. H.; KHALEL, K. I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 437-445, 2013.

RODRIGUES, M. R. A.; KANAZAWA, L. K. S.; DAS NEVES, T. L. M.; DA SILVA, C. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 519-526, 2012a.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; SILVA, L. M. C. M.; ARAÚJO, I. W. F.; QUEIROZ, I. N. L.; PAULA, G. A.; ABREU, T. M.; RIBEIRO, N. A.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; JORGE, R. J. B.; MONTEIRO, H. S. A.; LEITE, E. L.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 282-292, 2012b.

ROSSATO A. E.; PIERINI M. M.; AMARAL P. A.; SANTOS R. R.; CITADINI-ZANETTE V. **Fitoterapia Racional: Aspectos Taxonômicos, Agroecológicos,**

Etnobotânicos E Terapêuticos. Diretoria da Imprensa Oficial e Editora de Santa Catarina, v. 1, 216p, 2012.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry.** Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, v. 99, p. 255-276, 2008.

SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, p. 237-243, 2004.

SEBAI, H.; JABRI, M. A.; SOULI, A.; RTIBI, K.; SELMI, S.; TEBOURBI, O.; EL-BENNA, J.; SAKLY, M. Antidiarrheal and antioxidant activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 327-332, 2014.

SILVA, B. P.; SILVA, G. M.; PARENTE, J. P. Chemical properties and adjuvant activity of a galactoglucomannan from *Acrocomia aculeata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 380-384, 2009.

SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Pectins: structure, functionality, and uses. In: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food polysaccharides and their applications.** 2ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 353-412, 2006.

SIMAS-TOSIN, F. F.; BARRAZA, R. R.; MARIA-FERREIRA, D.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; WAGNER, R.; SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Glucuronoarabinoxylan from coconut palm gum exudate: Chemical structure and gastroprotective effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 65-71, 2014.

SOUSA, M. P., MATOS, M. E. O., MATOS, F. J. A., MACHADO, M. I. L., CRAVEIRO, A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras.** Fortaleza: Edições UFC. Laboratório de Produtos Naturais, 416p, 1991.

SOUZA, R. O. S.; ASSREUY, A. M. S.; MADEIRA, J. C.; CHAGAS, F. D. S.; PARREIRAS, L. A.; SANTOS, G. R. C.; MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. G. Purified polysaccharides of *Geoffroea spinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 208-215, 2015.

TADAIESKY, M. T.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. **European Journal of Pharmacology**, v.535, p. 199-207, 2006.

TAHMOUZI, S; GHODSI, M. Optimum extraction of polysaccharides from motherwort leaf and its antioxidant and antimicrobial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 396-403, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5ed. Sinauer Associates, 782p, 2010.

TANG, H. L.; CHEN, C.; WANG, S. K.; SUN, G. J. Biochemical analysis and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 235-242, 2015.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A. Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 16-27, 2012.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry-Moscow**, v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972.

TIAN, J.; CHE, H.; HA, D.; WEI, Y.; ZHENG, S. Characterization and anti-allergic effect of a polysaccharide from the flower buds of *Lonicera japonica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1642-1647, 2012.

VAN DE WIELE, T.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H.; VERSTRAETE, W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 452-460, 2007.

VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Inulin metabolism in dicots: Chicory as a model system. **Plant Cell and Environment**, v. 25, p. 803-813, 2002.

VANACLOCHA, B. V.; FOLCARÁ, S. C. **Fitoterapia: Vademécum De Prescripción**. 4. ed. Barcelona: Masson, 1091p, 2003.

VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ, J. R.; GONZÁLEZ-CERVANTES, R. M.; HERNÁNDEZ-GALLEGOS, M. A.; MENDIOLA, R. C.; JIMÉNEZ APARICIO, A. R. J.; OCAMPO, M. L. A. Prebiotic potential of *Agave angustifolia* haw fructans with different degrees of polymerization. **Molecules**, v. 19, p. 12660-12675, 2014.

VIGNON, M. R.; GEY, C. Isolation, ¹H and ¹³C NMR studies of (4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylans from luffa fruit fibres, jute bast fibres and mucilage of quince tree seeds. **Carbohydrate Research**, v. 307, p. 107- 111, 1998.

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

VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, 2003.

VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W.; THIBEAULT, J.-F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. Pectins. In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides And Their Applications**. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 287-340, 1995.

VRIESMANN, L. C.; AMBONI, R. D. M. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1173-1181, 2011.

VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 72-79, 2009.

WAGNER, H.; JORDAN, E. an immunologically active arabinogalactan from *Viscum album* 'berries'. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2511-2517, 1988.

WAGNER, H.; PROKSCH, A.; RIESS-MAURER, I.; VOLLMAR, A.; ODENTHAL, S.; STUPPNER, H.; JURCIC, K.; TURDU, M.; YEUR, Y. H. Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen. **Arzneimittel Forschung - Drug Research**, v. 34, p. 659-661, 1984.

WANG, H.; SHI, S.; BAO, B.; LI, X.; WANG, S. Structure characterization of an arabinogalactan from green tea and its anti-diabetic effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 98-108, 2015a.

WANG, J.; FLAISHER-GRINBERG, S.; LI, S.; LIU, H.; SUN, L.; ZHOU, Y.; EINAT, H. Antidepressant-like effects of the active acidic polysaccharide portion of ginseng in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 65-69, 2010.

WANG, P.; ZHANG, L.; YAO, J.; SHI, Y.; LI, P.; DING, K. An arabinogalactan from flowers of *Panax notoginseng* inhibits angiogenesis by BMP2/Smad/Id1 signaling. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 328-335, 2015b.

WILKIE, K. C. B. The hemicelluloses of grasses and cereals. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 36, p. 215-264, 1979.

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

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

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

XIE, X.; WANG, J.; ZHANG, H. Characterization and antitumor activities of a water-soluble polysaccharide from *Ampelopsis megalophylla*. **Carbohydrate Polymers** 129, p. 55-61, 2015.

XU, L.; YANG, F.; WANG, J.; HUANG, H.; HUANG, Y. Anti-diabetic effect mediated by *Ramulus mori* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 63-69, 2015.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, n. 4, p. 269-276, 1994.

YANG, L. Q.; 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.

YANG, Q.; HUANG, B.; LI, H.; ZHANG, C.; ZHANG, R.; HUANG, Y. WANG, J. Gastroprotective activities of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 1224-1228, 2012.

YE, C.; HAN, N.; TENG, F.; WANG, X.; XUE, R.; YIN, J. Extraction optimization of polysaccharides of *Schisandrae Fructus* and evaluation of their analgesic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 291-296, 2013.

YOON, S. J.; PEREIRA, M. S.; PAVAO, M. S. G.; HWANG, J. K.; PYUN, Y. R.; MOURÃO, P. A. S. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. **Thrombosis Research**, v. 106, n. 1, p. 51-58, 2002.

YORK, W. S. et al. 3-Deoxyl-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. **Carbohydrate Research**, v. 138, p. 109-126, 1985.

YU, Z.; JIN, C.; XIN, M.; JIANMIN, H. Effect of *Aloe vera* polysaccharides on immunity and antioxidant activities in oral ulcer animal models. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 307-311, 2009.

ZHANG, J.; WANG, H.; ZHENG, Q. Cardioprotective effect of *Aralia elata* polysaccharide on myocardial ischemic reperfusion (IR) injury in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 328-332, 2013.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 657

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

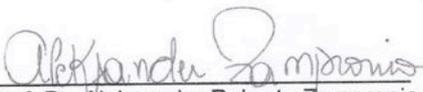
PROCESSO: 23075.038188/2012-32

APROVADO: 30/11/2012 – R.O. 11/2012

TÍTULO: Caracterização da atividade biológica de polissacarídeos isolados de cogumelos comestíveis e plantas medicinais

AUTORES: Crisiane Hatsuko Baggio, Maria Fernanda de Paula Werner, Adair Roberto Soares dos Santos, Daniele Maria-Ferreira, Luísa Mota da Silva, Marina Machado Córdova

DEPARTAMENTO: Farmacologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 809

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

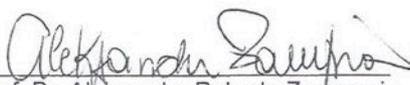
PROCESSO: 23075.015994/2014-02

APROVADO: 05/08/2014 – R.O. 06/2014

TÍTULO: Avaliação da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e gastroprotetora de polissacarídeos da *Chamomilla recutita* (camomila)

AUTORES: Lucimara Mach Cortes Cordeiro, Pedro Felipe Pereira Chaves, Maria Fernanda de Paula Werner, Claudia Rita Corso, Luisa Mota da Silva

DEPARTAMENTO: Bioquímica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA