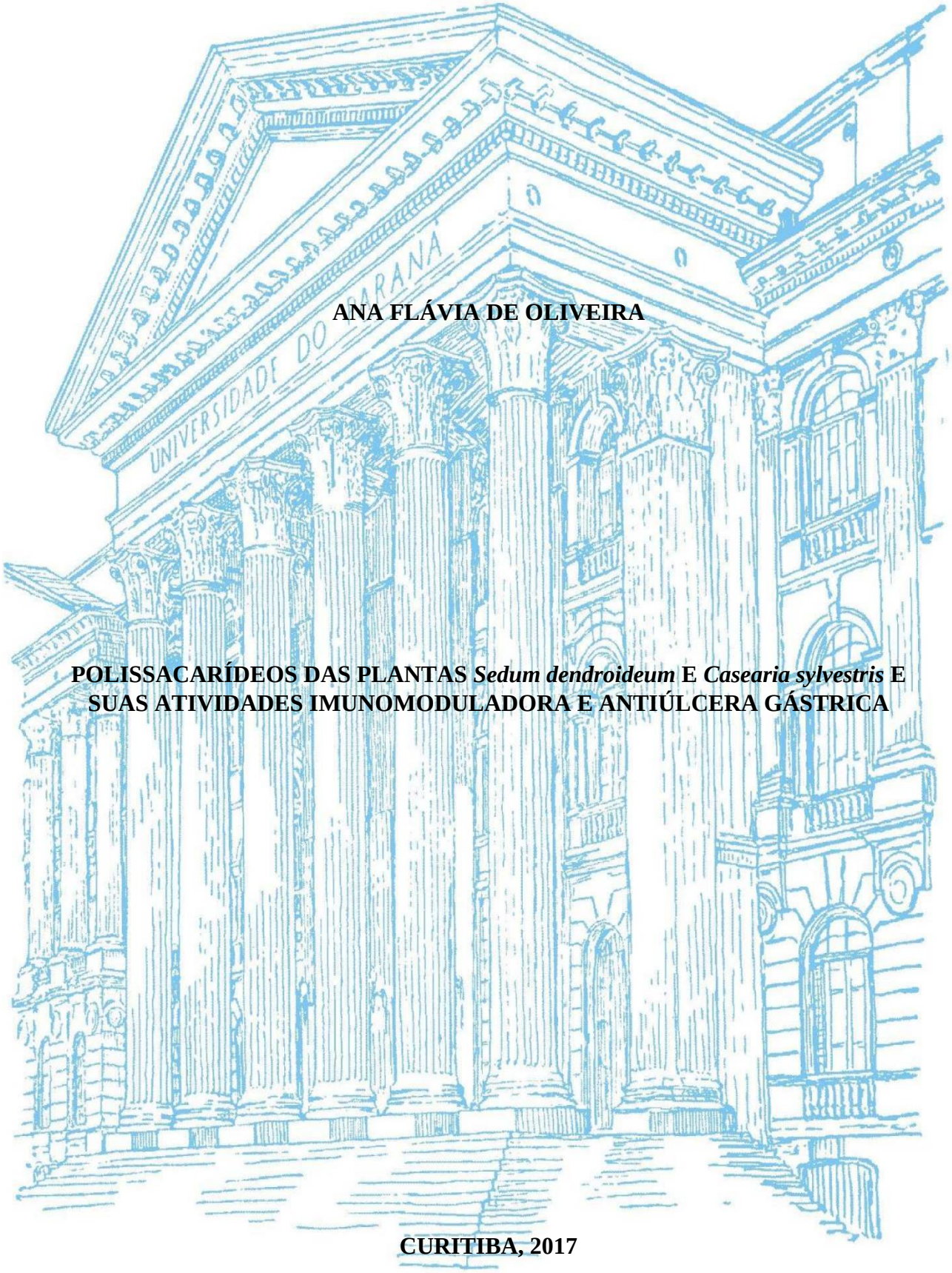
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA

POLISSACARÍDEOS DAS PLANTAS *Sedum dendroideum* E *Casearia sylvestris* E SUAS ATIVIDADES IMUNOMODULADORA E ANTIÚLCERA GÁSTRICA

CURITIBA, 2017

ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA

POLISSACARÍDEOS DAS PLANTAS *Sedum Dendroideum* E *Casearia Sylvestris* E SUAS ATIVIDADES IMUNOMODULADORA E ANTIÚLCERA GÁSTRICA

Tese de doutorado 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 a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucimara M.C. Cordeiro

Curitiba, 2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Oliveira, Ana Flávia de
Polissacarídeos das plantas *Sedum dendroideum* e *Casearia sylvestris* e suas atividades imunomoduladora e antiúlcera gástrica. / Ana Flávia de Oliveira. – Curitiba, 2017.
156 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Thales Ricardo Cipriani
Coorientador: Lucimara M. C. Cordeiro

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

1. Úlcera gástrica 2. Imunomodulação 3. Polissacarídeos 4. Casearia I. Título II. Cipriani, Thales Ricardo III. Cordeiro, Lucimara Mach C. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192482

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **ANA FLAVIA DE OLIVEIRA**, intitulada: "**POLISSACARÍDEOS DAS PLANTAS *Sedum dendroideum* E *Casearia sylvestris* E SUAS ATIVIDADES IMUNOMODULADORA E ANTIÚLCERA GÁSTRICA**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Julho de 2017.

THALES RICARDO CIPRIANI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ARILDO JOSÉ BRAZ DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UEM)

CARMEN LUCIA DE OLIVEIRA PETKOWICZ
Avaliador Interno (UFPR)

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS TOSIN
Avaliador Externo (UFPR)

RODRIGO VASSOLER SERRATO
Avaliador Interno (UFPR)

NOTA EXPLICATIVA

Esta tese está estruturada na forma de artigo segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica e do Sistema de Bibliotecas (SiBi) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A tese contém introdução, revisão bibliográfica, objetivos, artigos científicos, resultados complementares, referências e conclusões. Os artigos científicos incluem revisão bibliográfica, materiais, metodologias, resultados, discussão de resultados, conclusão e referências.

RESUMO

As plantas *Sedum dendroideum* e *Casearia sylvestris,* conhecidas popularmente como bálsamo e guaçatonga, respectivamente, são amplamente utilizadas pela população para diversas enfermidades, incluindo tratamento de úlceras e alterações relacionadas a processos inflamatórios. No presente trabalho foram avaliadas as atividades imunomoduladora e antiúlcera gástrica de polissacarídeos do infuso das folhas de *S. dendroideum* e *C. sylvestris*. O processo de infusão das folhas de *S. dendroideum* e as etapas de purificação (congelamento e degelo, e diálise em membrana de exclusão de 100 kDa), forneceu dois principais polissacarídeos RSBAL e ESBAL. RSBAL foi submetido a cromatografia de troca aniônica, com eluição sequencial por H_2O e NaCl 0,5 M gerando, respectivamente, as frações RSBAL-H_2O (25% de rendimento) e RSBAL-0.5 (62% de rendimento). Análises de metilação e RMN-HSQC permitiram caracterizar RSBAL-H_2O como sendo uma homogalacturonana altamente metil-esterificada, constituída por unidades de α-D-Gal*p*A (1→4)-ligadas, e RSBAL-0.5 como sendo uma homogalacturonana altamente metil-esterificada, ramificada em O-3 por cadeias de arabinogalactana do tipo II e arabinana. RSBAL-H_2O e RSBAL-0.5 foram capazes de estimular a secreção das citocinas TNF-α, IL1-β e IL-10 por macrófagos THP-1, atuando como agentes imunoestimuladores. Por outro lado, eles reduziram a secreção de TNF-α e IL1-β induzida por LPS, um agente pró-inflamatório, mostrando, portanto, efeito anti-inflamatório. Além disso, foi demonstrado que a fração RSBAL (RSBAL-H_2O + RSBAL-0.5) apresenta efeito gastroprotetor, preservando o muco gástrico e os níveis de GSH em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Com relação à *C. sylvestris*, a partir da infusão das suas folhas, seguida de processos de purificação (congelamento e degelo, e diálise em membrana de exclusão de 100 e 50 kDa), foram obtidas as frações R100, R50 e E50. Análises de metilação e RMN-HSQC permitiram caracterizar E50 como sendo uma fração constituída por arabinogalactana do tipo II, além de arabinanas com unidades de α-L-Ara*f* (1→3) e (1→5)-ligadas. O polissacarídeo bruto (R100 + R50 + E50) e a fração E50 foram capazes de promover proteção aguda contra úlcera gástrica induzida por etanol em ratos. Além disso, E50 também inibiu o desenvolvimento de úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os efeitos farmacológicos do infuso das plantas *S. dendroideum* e *C. sylvestris* são, podem ser promovidos por polissacarídeos.

Palavras-chaves: *Casearia sylvestris, Sedum dendroideum,* polissacarídeos, atividade gastroprotetora, atividade imunomoduladora

ABSTRACT

The plants *Sedum dendroideum* and *Casearia sylvestris*, popularly known as balm and guaçatonga, respectively, are widely used by the population to treat various diseases, including ulcers and inflammatory processes. The present study evaluated the immunomodulatory and gastric antiulcer activities of polysaccharides from the infusion of *S. dendroideum* and *C. sylvestris* leaves. The infusion process of *S. dendroideum* leaves, followed by purification steps (freezing and thawing, and dialysis at 100 kDa cut-off membrane) provided two main polysaccharides (RSBAL and ESBAL). RSBAL was subjected to anion exchange chromatography, with sequential elution by H_2O and 0.5 M NaCl generating the fractions RSBAL-H_2O (25% yield) and RSBAL-0.5 (62% yield). Methylation and HSQC-NMR analyses allowed the characterization of RSBAL-H_2O as a highly methyl-esterified homogalacturonan composed of α-D-Gal*p*A (1→4)-linked units; and RSBAL-0.5 as a highly methyl-esterified homogalacturonan, branched at O-3 by type II arabinogalactan and arabinan chains. RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5 were able to stimulate the secretion of the cytokines TNF-α, IL1-β and IL-10 by THP-1 macrophages, acting as immunostimulatory agents. On the other hand, they reduced the secretion of TNF-α and IL1-β induced by LPS, a pro-inflammatory agent, thus showing anti-inflammatory effect. In addition, it was demonstrated that the RSBAL fraction (RSBAL-H_2O + RSBAL-0.5) has a gastroprotective effect, preserving gastric mucus and GSH levels in ethanol-induced ulcer model in rats. With respect to the *C. sylvestris*, fractions R100, R50 and E50 were obtained after infusion of its leaves, followed by purification processes (freezing and thawing, and dialysis at 100 and 50 kDa cut-off membranes). Methylation and HSQC-NMR analyses allowed characterizing E50 as a fraction consisting of type II arabinogalactan, as well as arabinans with α-L-Ara*f* units (1→3) and (1→5)-linked. The crude polysaccharide (R100 + R50 + E50) and E50 fraction were able to promote acute protection against ethanol-induced gastric ulceration in rats. Furthermore, E50 also inhibited the development of chronic ulcer induced by acetic acid in rats. The results obtained in this work demonstrate that the pharmacological effects of the infusion of the plants *S. dendroideum* and *C. sylvestris* are, can promoted by polysaccharides.

Keywords: *Casearia sylvestris*, *Sedum dendroideum*, polysaccharides, gastroprotective activity, immunomodulatory activity

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucimara M. C. Cordeiro

Dedicado a Ele...

Pois todas as coisas foram criadas por ele, e tudo existe por meio dele e para ele. Glória a Deus para sempre! Amém! (Romanos 11:16)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me acolhido, e me dado força para seguir. Sem Ele, minha vida não faria sentido.

Aos meus pais, Adênia e Moacir, por sempre terem sido pais amorosos e cuidadosos, pelo apoio aos estudos, por sempre terem sido a minha segurança.

Ao meu amado amigo, companheiro e esposo, Vinicius, por ser tão companheiro, por me ajudar em tudo e por ser a "minha duplinha". Obrigada pelo companheirismo, pelo amor, e acreditar que eu sou capaz.

À Tia Zeni, pelo amor, pela orientação de vida, pelos conselhos, por me ouvir mesmo de longe, por me ajudar a manter o foco. Por sempre me lembrar de onde vem o nosso socorro, e por ser uma inspiração.

À minha amada prima Mariana, pelas conversas, pela amizade, pelo amor e pelo exemplo de determinação que você é.

A toda minha amada família, pelo carinho e apoio.

Ao meu orientador, professor Dr. Thales, pelos ensinamentos, pela orientação, pela oportunidade de realizar esse trabalho e por ser tão dedicado, sempre com uma solução para dar a nós (seus orientandos). Obrigada por acreditar em mim e por ser o melhor exemplo de pessoa/pesquisador/professor dentro do mundo acadêmico.

À Profa. Dra. Lucimara, pela co-orientação, sempre tão amável e doce conosco. Às professoras Dra. Carmen Petkowicz e Dra. Fernanda Simas por terem aceitado fazer parte da banca avaliadora e por serem sempre prestativas.

À Rosane, Ana, Arquimedes e Elis pelas análises de GC-MS, RMN e HPSEC.

À Geórgia, à Profª Maria Fernanda, Mariana Mion e Bruna pela colaboração com os testes *in vivo* e *in vitro*.

Às minhas amigas Adriana e Iglesias (Igrejinha) pela ajuda com meus experimentos e análises, pela amizade, carinho, paciência, risadas, sorvetes e aventuras.

Às amigas que Deus me deu: Liana, Shajane, Camila, Amanda e Ester pelas palavras, pelos conselhos, pela amizade e por tornarem nossas quartas-feiras sensacionais. Aos amigos de bancada Helyn, Carol, Pedro e Yony (Enóis!!), por toda ajuda e ensinamentos que me deram, pela amizade e convivência agradável.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências - Bioquímica pela dedicação prestada ao crescimento do curso e à CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ARTIGO I

ARTIGO II

ARTIGO III

RESULTADOS COMPLEMENTARES

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ARTIGO I

ARTIGO III

RESULTADOS COMPLEMENTARES

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOEt – Acetado de Etila
AG I – Arabinogalactana do Tipo I
AG II – Arabinogalactana do Tipo II
Ara – Arabinose
CP – Fração polissacarídica bruta obtida a partir do infuso das folhas de *Casearia sylvestris.*
D_2O – Óxido de deutério
DEPT - Intensificação sem distorção por transferência de polarização
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E100 – Fração polissacarídica, eluida em membrana de 100 kDa, obtida dos a partir da fração polissacarídica bruta, a qual foi obtida por infusão das folhas de *Casearia sylvestris.*
E50 – Fração polissacarídica, eluida em membrana de 50 kDa, advinda da fração E100, a qual foi obtida por infusão das folhas de *Casearia sylvestris*.
ELISA – (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ensaio de imunoabsorção enzimática.
ESBAL – Eluido em membrana de 100 kDa (*Sedum dendroium*)
ESI-MS – Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
EtOH – Etanol
Gal – Galactose
GalA – Ácido galacturônico
GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Glc – Glucose
GSH – Glutationa
HG – Homogalacturonana
HOAc – Ácido Acético
HPSEC – Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência
HSQC – Espectroscopia de correlação heteronuclear Single-Quantum
i.p. – Intraperitoneal
IL-10 – Interleucina 10
IL-1β – Interleucina -1β
ISC – Fração polissacarídica, obtida por infusão das folhas de *Casearia sylvestris*, a qual, no processo de fracionamento de congelamento e degelo, apresentou-se insolúvel em água fria.
LPS – Lipopolissacarídeo
m/z – Relação massa-carga
MALLS – detector de espalhamento de laser multiângulo
MES – [ácido 2-(Nmorfolina)-etanosulfônico]
MTT – (3,4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazólio)
n-PrOH – 1-Propanol
P.A. – Para análise

PBAL – Fração polissacarídica, obtida por infusão das folhas de *Sedum dendroideum*, a qual, no processo de fracionamento de congelamento e degelo, apresentou-se insolúvel em água fria.
PBS – Tampão fosfato salino
PCS – Fração polissacarídica, obtida por infusão das folhas de *Casearia sylvestris*, a qual, no processo de fracionamento de congelamento e degelo, apresentou-se insolúvel em água fria.
ppm – Partes por milhão
R100 – Fração polissacarídica retida em membrana de 100 kDa, obtida a partir da fração polissacarídica bruta, a qual foi extraída, por infusão, das folhas de *Casearia sylvestris*
RG I – Ramnogalacturonana do Tipo I
RGII – Ramnogalacturonana do Tipo II
Rha – Ramnose
RMN – Ressonância magnética nuclear
RSBAL – Fração polissacarídica retida em membrana de 100 kDa, obtida a partir da fração polissacarídica bruta, a qual foi extraída, por infusão, das folhas de *Sedum dendroideum*.
RSBAL-0.5 – Fração polissacarídica eluida com solução de NaCl 0,5 Molar, em cromatografia de troca aniônica, obtida a partir da fração RSBAL, a qual foi extraída, por infusão, das folhas de *Sedum dendroideum*.
RSBAL-H_2O – Fração polissacarídica eluida com água, em cromatografia de troca aniônica, obtida a partir da fração RSBAL, a qual foi extraída, por infusão, das folhas de *Sedum dendroideum*.
SBAL – Fração polissacarídica, obtida por infusão das folhas de *Sedum dendroideum*, a qual, no processo de fracionamento de congelamento e degelo, apresentou-se solúvel em água fria.
SCS – Fração polissacarídica, obtida por infusão das folhas de *Casearia sylvestris*, a qual, no processo de fracionamento de congelamento e degelo, apresentou-se solúvel em água fria.
TFA – Ácido trifluoroacético
TLC – Cromatografia de camada delgada
TNF-α – Fator de necrose tumoral
TRIS – 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
δ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais na prevenção e tratamento de doenças é uma prática muito antiga e de grande importância terapêutica. As plantas medicinais podem ser utilizadas como fonte de matérias-primas farmacêuticas, fonte de substâncias ativas isoladas utilizadas como protótipo de fármacos, e na forma de fitoterápicos (SIMÃO, 2013). No Brasil, o uso de produtos naturais sempre teve grande importância, principalmente depois da implantação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que visa o uso de plantas medicinais de forma segura, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria, observando cuidados com o meio ambiente.

Casearia sylvestris está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), cujo intuito consiste em listar plantas medicinais, a fim de nortear estudos e pesquisas para corroborar os conhecimentos populares, podendo assim, ser disponibilizadas para a população.

C. sylvestris é conhecida popularmente como guaçatonga, e é utilizada, na medicina popular, como antisséptico, anestésico, antitumoral, antiúlcera (BASILE, et al., 1990; SERTIE, et al., 2000). Diferentes trabalhos têm tratado de avaliações farmacológicas da *C. sylvestris*, demonstrado a importância dos extratos e de compostos obtidos a partir desta planta, corroborando, assim, com os relatos de usos na medicina tradicional. *C. sylvestris* tem possibilidade de tornar-se a base de um medicamento fitoterápico, devido a sua ampla distribuição e grande uso popular, o que estimula investigações farmacológicas e avaliação da segurança do seu uso (SANTOS, 2008).

Outra planta conhecida na medicina tradicional é a *Sedum dendroideum*. Suas folhas são empregadas topicamente para tratamento de inflamações cutâneas e contusões, e internamente para distúrbios gástricos, em razão das atividades emoliente e cicatrizante

(LORENZI e SOUZA, 1995; MILANEZE; GONÇALVES, 2001). As espécies de *Sedum* têm sido usadas na medicina popular (NIEMANN, VISSER-SIMONS e HART, 1976) e são conhecidas por conterem alcaloides, flavonoides, taninos, e compostos cianogênios (NIEMANN, VISSER-SIMONS e HART et al., 1976; MULINACCI et al., 1995) e apresentarem atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (MELO et al., 2009; MALVAR et al., 2004; CAMARGO et al., 2002). Suas folhas são utilizadas no tratamento de úlceras e feridas (CARLINI et al., 1970), e até como contraceptivo (SILVA-TORRES et al., 2003).

Segundo DINIZ (2006), moléculas bioativas de plantas de interesse medicinal têm sido amplamente estudadas nos últimos anos, devido à crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos. Porém, muitos dos compostos químicos responsáveis por diversas atividades biológicas, proveniente de diversas plantas, ainda não estão caracterizados. Os polissacarídeos formam uma importante classe de compostos naturais bioativos (SIMÕES et al., 2003). Algumas das atividades biológicas relatadas para estes compostos são: atividade imunomoduladora, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e antiúlcera gástrica (NERGARD et al., 2005; CARBONERO et al., 2008; CIPRIANI et al., 2006; JIANG et al., 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR

Carboidratos estruturais estão presentes na parede celular, sendo considerados os compostos mais abundantes da Terra (REID, 1997). A parede celular confere resistência e forma para a célula, controla o crescimento celular, participa na comunicação célula-célula e protege a célula contra o ataque de patógenos e predadores (BRETT e WALDRON, 1990). A parede celular dos vegetais é altamente organizada, sendo constituída principalmente de polissacarídeos, além de proteínas e substâncias aromáticas (McNEIL et al., 1984). Os polissacarídeos da parede celular são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA e McCANN, 2000). As microfibrilas de celulose, entrelaçadas com hemiceluloses em uma fase contínua de pectina e, além da lignina em paredes celulares secundárias (WHISTLER, 1970).

Cosgrove (2005) propõe uma parede celular (Fig.1) na qual as microfibrilas de celulose são sintetizadas na membrana plasmática, enquanto as hemiceluloses e pectinas são sintetizadas no complexo de golgi e depositadas na superfície da parede por vesículas. Na maioria das espécies vegetais, a principal hemicelulose é a xiloglucana, e em menores quantidades, as arabinoxilanas e mananas.

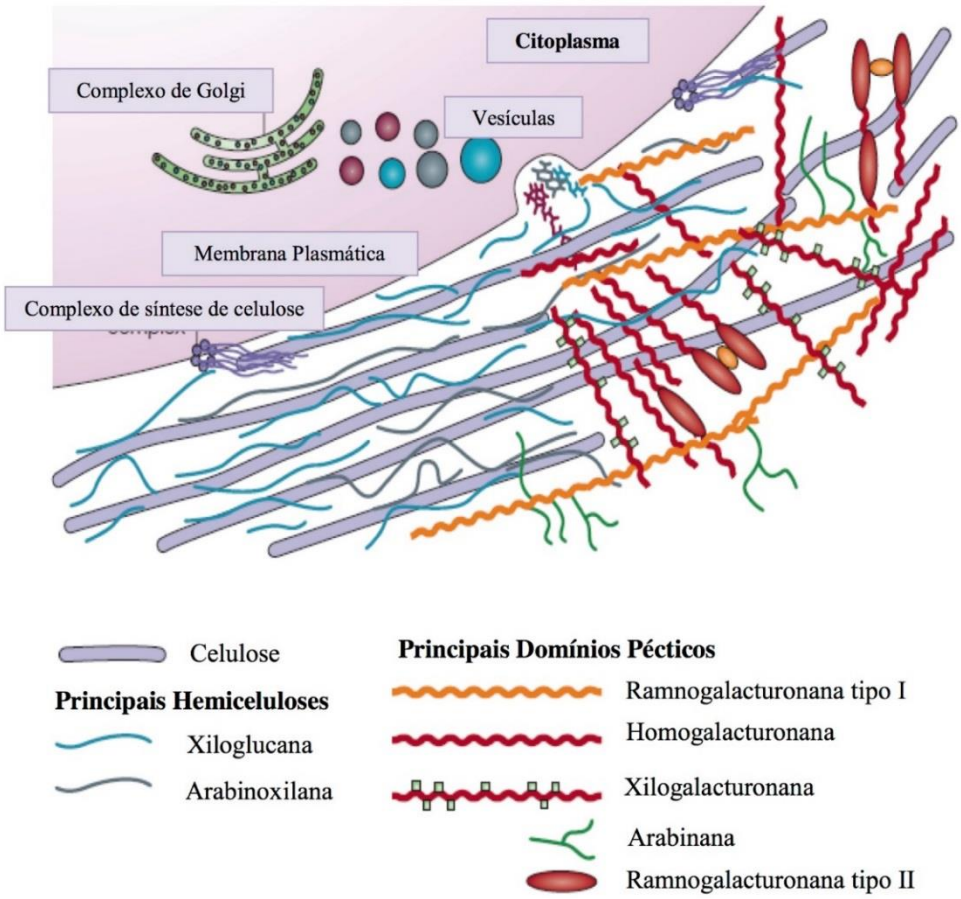


Figura 1. Ilustração esquemática da estrutura da parede celular primária vegetal (Adaptado de COSGROVE, 2005).

2.1.1 Polissacarídeos pécticos

Reid (1997) descreve as pectinas como um grupo complexo de polissacarídeos, alguns dos quais podem ser domínios estruturais de moléculas maiores e mais complexas. Segundo o autor, as pectinas estão presentes nas paredes celulares primárias, sendo o principal componente dessas estruturas. As classes das pectinas englobam as homogalacturonanas (HG) e as ramnogalacturonana do tipo I (RG I) (CARPITA e GIBEAUT, 1993). A terceira classe de polissacarídeos pécticos, ricos em ácidos galacturônico, são as as ramnogalacturonana do tipo II (RG II). Arabinanas, galactanas e arabinogalactanas são frequentemente encontradas em frações pécticas, constituindo cadeias laterais das RG I (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990).

As pectinas contêm grandes proporções de ácido α-D-galacturônico unidos por ligações (1→4), podendo apresentar grupos metil esterificando o carbono 6 e grupos acetil nas posições O-2 ou O-3 (REID, 1997). As HG são polímeros lineares de α-D-Gal*p*A (1→4)-ligados (RIDLEY et al., 2001).

As RG I são constituídas por repetições do dissacarídeo [→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→] (LAU et al., 1985; CARPITA e GIBEAUT, 1993). As RG I podem ser estendidas por HG em seus terminais. As RG I frequentemente contêm cadeias laterais de arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (McNEIL et al., 1984; REID, 1997). Já as RG II são constituídas por cerca de 12 diferentes tipos de monossacarídeos, interligados por mais de 20 diferentes tipos de ligações glicosídicas, o que resulta em macromoléculas altamente complexas (YAPO, 2011).

As arabinogalactanas (AG) podem compor as cadeias laterais das RG I e também serem encontradas independentemente. Conforme a estrutura de sua cadeia principal, elas podem ser classificadas em dois grupos: arabinogalactanas do tipo I (AG I) cujas cadeias principais são formadas por unidades de β-D-Gal (1→4)-ligadas, substituídas, principalmente, em O-3 por unidades de arabinose, e arabinogalactanas do tipo II (AG II) formadas por unidade de β-D-Gal (1→3)- e (1→6)-ligadas (ASPINAL, 1973), conectadas umas às outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6, apresentando a maior parte das posições O-3 e O-6 restantes ocupadas por unidades de arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993). As AG II podem, ainda, estar ligadas a proteínas, constituindo uma classe de glicoproteínas denominadas arabinogalactanas-proteínas. Estas glicoproteínas estão envolvidas no reconhecimento célula-célula e na regulação da expansão e divisão celular (FINCHER et al., 1983; VARNER e LIN, 1989; SCHINDLER et al., 1998).

As arabinanas são polissacarídeos pécticos altamente ramificados, formados por L-arabinose, principalmente na forma de anel furanosídico. A cadeia principal é,

geralmente, constituída por unidades α-(1→5)-ligadas, formando cadeias helicoidais curtas, e as cadeias laterais são formadas por unidades de α-(1→3)- e α-(l→2)-ligadas (REID, 1997; CARPITA e GIBEAUT, 1993). Um esquema contendo os principais polissacarídeos pécticos é mostrado na Figura.2

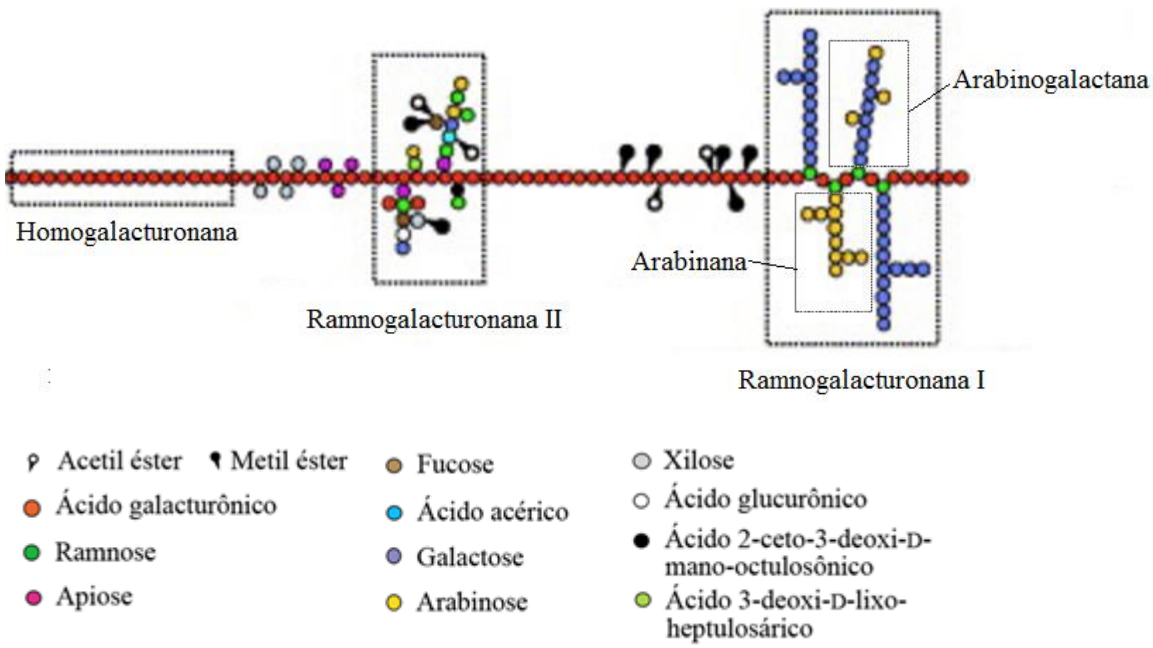


Figura. 2. Polissacarídeos pécticos da parede celular. Fonte: adaptado de Willats et al. (2006).

2.1.2 Atividades farmacológicas de polissacarídeos

Polissacarídeos são considerados uma importante classe de produtos naturais bioativos. Diversos trabalhos têm demonstrado que polissacarídeos de origem vegetal possuem atividade antitumoral (ZONG et al., 2012; GAN, et al., 2004) imunomoduladora (NERGARD et al., 2005; GAN, et al., 2004), anti-inflamatória (BEZERRA, 2016) anticoagulante (BARDDAL et al., 2015; OCHOA, et al., 2017) e, também, atividade antiúlcera gástrica (NERGARD et al., 2005; CIPRIANI et al., 2008; CIPRIANI et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2013).

2.1.2.1 Atividade antiúlcera de polissacarídeos

A úlcera gástrica é uma lesão profunda da mucosa, que pode destruir tanto os componentes do tecido epitelial como do conectivo, incluindo células do músculo liso, vasos e nervos (MILANI e CALABRO, 2001). O método frequentemente utilizado na avalição de atividade gastroprotetora consiste na verificação da proteção que as moléculas estudadas proporcionam contra lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (ROBERT et al., 1979).

Diversos trabalhos na literatura demonstram polissacarídeos com atividades gastroprotetora. Cordeiro et al., (2012) descreveram uma arabinana (1→5)-ligada e uma pectina rica em arabinana, isolada de *Chenopodium quinoa*, a qual reduziu a área de lesão gástrica, induzida por etanol, em até 72%. Maria-Ferreira et al., (2013) avaliaram o potencial gastroprotetor de uma arabinogalactana do tipo I, isolada de folhas de mate (*Ilex paraguariensis*). Os resultados mostraram que as frações polissacarídicas inibiram as lesões gástricas, induzidas pelo etanol, em até 89%. Cipriani et al., (2009a) isolaram uma homogalacturonana, a partir do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia*. As lesões gástricas induzidas por EtOH foram reduzidas de forma dose-dependente. Cantu-Jungles et al., (2014) isolaram, dos frutos secos de *Prunus domestica*, uma ramnogalacturonana com cadeias laterais de arabinogalactanas de tipo I. As frações polissacarídicas mostram atividade gastroprotetora, reduzindo a área da lesão gástrica em até 84%. Nascimento et al., (2013) obtiveram uma ramnogalacturonana substituída por cadeias laterais arabinogalactanas do tipo II, a qual também foi capaz de inibir, eficazmente, lesões gástricas induzidas pelo etanol.

Vários outros estudos demonstram atividade antiúlcera de pectinas: arabinogalactanas tipo II de *Maytenus ilicifolia* (CIPRIANI, 2006), ramnogalacturonana com cadeia lateral de galactana da *Bupleurum falcatum* (YAMADA, 1994),

arabinogalactana de tipo II de *Cochlospermum tinctorium* (NERGARD et al., 2005), arabinogalactana tipo I de farelo de soja (CIPRIANI et al., 2009b), arabinogalactanas do tipo I (TANAKA et al, 2010).

Possivelmente, os mecanismos responsáveis pelo do efeito gastroprotetor de polissacarídeos, estão relacionados à habilidade destes polímeros formarem uma camada protetora sobre a mucosa gástrica, terem efeito sobre à atividade antissecretora de suco gástrico ou ter capacidade de aumentar da síntese de muco e sequestrar de radicais livres (NERGARD et al., 2005; MATSUMOTO et al., 1993; YAMADA, 1994; CIPRIANI et al., 2006).

2.1.2.2 Atividade imunomodulatória de polissacarídeos.

Estudos sobre os efeitos de pectinas sobre a imunidade são de grande interesse por causa da importância do sistema imunológico de humanos e animais. A regulação do sistema imunológico pode levar a tratamentos profiláticos e possivelmente cura para várias doenças. Portanto, as substâncias que aumentam a imunidade enfraquecida ou diminuem as reações imunes indesejáveis têm sido extensivamente estudadas (POPOV, OVODOV, 2013).

Polissacarídeos podem modular o sistema imunológico de diferentes modos: interferindo na atuação de macrófagos, estimulando da atividade fagocitária, aumentando da produção de espécies reativas de oxigênio, ou alterando a secreção de citocinas que medeiam a imunidade inata (SCHEPETKIN e QUINN, 2006; SCHEPETKIN et al., 2005; KOUAKOU et al., 2013; FREYSDOTTIR, et al., 2016; YAMASSAKI et al., 2015).

Vários trabalhos descrevem atividades biológicas de polissacarídeos de espécies vegetais e de interesse medicinal, os quais estão relacionados com o sistema imune: Sendl et al., 1993, descreveram duas ramnogalacturonanas, obtidas a partir das folhas de *Sedum*

telephium, que apresentaram efeito anticomplementar *in vitro*, induziram a produção de TNF-α e aumentaram a fagocitose *in vitro* e *in vivo*. Ghaoui et al., (2008) mostraram o aumento da atividade fagocítica de macrófagos, efeito no sistema complemento, e atividade imunomoduladora de uma ramnogalacturonana obtida a partir das folhas de Malva (*Malva sylvestris*). Yamada et al., (1985) relatam efeitos sobre o sistema complementar de uma arabinogalactana obtida a partir das folhas de *Artemisia princeps.* Hirazumi e Furuzawa, (1999) relataram a produção de citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-10, IL-12) e óxido nítrico por macrófagos murinos, estimulados por arabinogalactanas AGs obtidas de *Morinda citrifolia*. Lenzi et al., (2013), observaram atividade imunoestimulante em macrófagos, de uma AGP (arabinogalactana-proteína) obtida de *Uncaria tomentosa*. Schepetkin et al., (2005) obtiveram AGs de *Juniperus scopolorum,* as quais estimularam diretamente a produção de óxido nítrico, por meio da indução de óxido-nítrico sintase e induziram macrófagos a secretarem tanto citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF-α e IL-12) quanto anti-inflamatória (IL-10).

Com os vários efeitos imunomoduladores atribuídos a polissacarídeos obtidos de plantas medicinais, estas moléculas mostram grande potencial para uso no tratamento de disfunções do sistema imunológico, pois podem atuar modificando respostas biológicas por meio da modulação do sistema imunológico.

2.2 *CASEARIA SYLVESTRIS*

Casearia sylvestris (Fig. 3) é amplamente distribuída por todo o território nacional, desde o Estado do Amazonas (região do rio Tapajós) até o Estado do Rio Grande do Sul (TORRES e YAMAMOTO, 1986). No Brasil, a *C. sylvestris* é conhecida principalmente como guaçatonga, uma palavra originária do tupi-guarani (ESTEVES et al., 2005). Vários relatos na literatura têm demonstrado o valor medicinal de extratos e

compostos isolados da *C. sylvestris*, observando o potencial farmacológico, trazendo evidências para seu uso popular e incentivando novos estudos sobre suas moléculas bioativas (FERREIRA et al., 2011).

A **B**

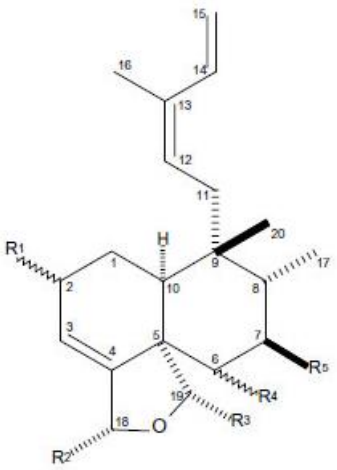
Figura 3. (A) Folhas de *C. sylvestris* (Gandi, 2014); (B) *C. sylvestris* florida (LORENZI, 2002).

Estudos taxonômicos foram desenvolvidos por Torres e Yamamoto (1986), baseados nas obras de Eichler (1871) e Sleumer (1980) com espécies de *Casearia*. A *C. sylvestris* é um subarbusto a árvore com 1,5 a 10 metros de altura. Apresenta ramos com extremidade glabra a pubescente; folhas são lenticelas esparsas a numerosas; folhas geralmente maduras, às vezes jovens na floração, oblongas, elípticas ou ovado-oblongas, de base atenuada, simétrica à assimétrica, com cerca de 5,0-12,0 x 2,0-3,5 cm.

2.2.1 Componetes químicos relatados para *C. sylvestris*

Um grande número de estudos fitoquímico com *Casearia sylvestris* tem mostrado a ocorrência diterpenos clerodânicos (Fig. 4), estes compostos, foram denominados de casearinas (SANTOS et al., 2007; SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2010). Além das casearinas, outros diterpenos clerodânicos, conhecidos como casearvestrinas, têm sido identificados nas folhas de *C. sylvestris* (ORBELIES et al., 2002; FERREIRA, 2006).

A



B

Casearinas	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
A	α-OMe	OAc	OAc	α-OH	OBu
B	α-OMe	OAc	OAc	α-OAc	OBu
C	α-OH	OAc	OAc	α-OAc	ODc
D	α-OH	OBu	OAc	α-OH	OBu
E	α-OH	OEt	OAc	α-OH	ODc
F	α-OH	OEt	OAc	α-OH	OBu
G	α-OMe	OAc	OAc	H	OBu
H	α-OH	OAc	OAc	H	OBu
I	α-OH	OAc	OBu	H	OBu
J	α-OMe	OBu	OAc	α-OH	OBu
K	α-OAc	OAc	OAc	α-OH	OBu
L	α-OMe	OBu	OAc	α-OAc	OH
M	α-OH	OBu	OBu	α-OAc	OH
N	α-OMe	OAc	OBu	α-OAc	OBu
O	α-OMe	OBu	OAc	α-OAc	OBu
P	α-OMe	OAc	OAc	α-OAc	OAc
Q	α-OH	OAc	OAc	α-OAc	OBu
R	=O	OAc	OAc	α-OH	OBu
S	α-OMe	=O	OAc	H	OBu
T	α-OMe	OAc	OAc	β-OAc	OBu
U	α-OBu	OBu	OAc	α-OH	H
X	α-OBu	OAc	OAc	H	OBu
Y	α-OMe	OAc	OBu	H	OBu
Caseargrewiina F	α-OBu	OAc	OAc	OH	H
Casearvestrina					
A	β-isoOBu	OAc	OAc	α-OH	H
B	β-OMeBu	OAc	OAc	α-OH	H
C	β-OHex	OAc	OAc	α-OH	H

Figura 4. Estrutura química das casearinas e casearvestrina. (A) Estrutura geral das casearinas; (B) Respectivos substituintes: O-Me: O-CH_3; OAc: CH_3CO_2; OBu: $C_3H_7CO_2$; ODeC: $C_9H_{19}CO_2$; IsoOBu: $(CH_3)_2CHCO_2$; β-OMeBu: $CH_3CH_2CH(CH_3)CO_2$; β-OHex: $C_5H_{11}CO_2$. Fonte: Adaptação de Passareli, 2010.

2.2.1 Atividades farmacológicas relatadas para C. sylvestris

O grande interesse nas propriedades farmacológicas de *C. sylvestris* pode ser comprovado pela elevada quantidade de trabalhos científicos com esta planta. Os estudos compreendem a otimização de métodos de extração, isolamento e identificação de metabólitos secundários responsáveis por atividades biologias de interesse e, também, a busca de novos compostos bioativos. Na literatura há diversos trabalhos sobre as

propriedades farmacológicas de diferentes extratos da *C. sylvestris.* Alguns dos trabalhos são referidos nas tabelas (1, 2, 3, 4, 5 e 6) a seguir

Tabela 1. Atividade antiulcera relatada para *C. sylvestris*

Extrato/Parte da planta	**Compostos responsáveis**	**Referência bibliográfica**
Extrato etanólico das folhas	Óleos voláteis, taninos e triterpenos	Basile et al., (1990)
Extratos brutos das folhas secas e frescas	Óleos voláteis, taninos e compostos relacionados com os triterpenos	Sertié et al., (2000)
Extrato etanólico das folhas	Casearinas B, D, O, X e F	Santos (2008)
Extrato etanólico das folhas	-	Fialho et al., (2010)
Extrato fluido (infusão em água e álcool etílico) e extrato metanólico	Flavonóides (quercetina, rutina, kaempferol) e terpenos (espatulenol, diterpeno clerodânico).	Ameni (2015)

- Os autores não identificaram ou não sugeriram compostos responsáveis pela atividade.

Tabela 2. Atividade antitumoral observada para diferentes extratos da *C. sylvestris*

Extrato/Parte da planta	Compostos responsáveis	Referência bibliográfica
Extrato etanólico das folhas	Diterpenos clorodanos (casearinas)	Itokawa et al., (1988 e 1990)
Extrato hidroalcóolico das folhas	Diterpenos, alcalóides e flavonóides	Almeida (1999)
Extrato etanólico das folhas	Casearina U	Ferreira (2006)
Extrato hidroalcóolico das folhas	-	Lima (2008)
Óleo essencial das folhas	β-cariofileno e α-humuleno	Silva et al., (2008)
Óleo essencial bruto das folhas	α-zingibereno em sinergia com as demais substancias presentes no óleo essencial	Bou et al., (2013)
Extrato etanólico das folhas	Derivados de ácido gálico	Da Silva et al., (2009)
Extrato hexânico da casca do caule	Glaucarubinona	Mesquita et al., (2009)
Extrato etanólico das folhas	Casearinas	Ferreira et al. (2010)
Extrato isopropílico das folhas	-	Guil-Guerrero; Campra (2009)
Extrato etanólico das folhas	-	Felipe (2010)
Extrato etanólico das folhas	Casearina X	Dos Santos et al., (2010)
Extrato supercrítico das folhas	-	Bücker (2012)
Extrato hidroalcóolico das folhas	-	Santos (2013)
Extrato hidroalcóolico das folhas	Ácido gálico	Felipe et al., (2014)
Extrato metanólico das folhas	Casearinas e caseavestrinas	Ameni (2015)
Extrato etanólico das folhas	Casearina D	Lages (2016)
Extrato etanólico das folhas	Casearinas e casearina X isolada	Ferreira et al., (2016)

- Os autores não identificaram ou não sugeriram compostos responsáveis pela atividade.

Tabela 3. Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva relatada para *C. sylvestris*

Extrato/Parte da planta	Compostos responsáveis	Referência bibliográfica
Extrato aquoso das cascas e das folhas	-	Ruppelt et al., (1991)
Extrato etanólico das folhas	-	Camargo et al., (1996)
Extrato hidroalcóolico das folhas	Diterpenos, alcalóides e flavonóides	Almeida (1999)
Extrato hidroalcóolico das folhas	-	Silva et al., (2004)
Decocto das folhas	-	Sassioto et al., (2004)
Óleo essencial de folhas	Compostos terpênicos	Esteves et al., (2005)
Extrato hidroalcóolico das folhas	-	Mattos et al., (2007)
Óleo essencial de folhas	Sesquiterpenos	Esteves et al., (2011)
Extrato hidroalcóolico das folhas	Terpenos, óleos essenciais e taninos	Albano et al., (2013)
Extrato hidroalcóolico das folhas	Terpenos e taninos	Campos et al., (2015)

- Os autores não identificaram ou não sugeriram compostos responsáveis pela atividade.

Tabela 4. Atividade sobre a capacidade de neutralização de venenos

Extrato/Parte da planta	Compostos responsáveis	Referência bibliográfica
Extrato aquoso das folhas	Taninos e flavonoides	Borges et al. (2001 e 2000)
Extrato hidroalcóolico das folhas	Flávonoides e compostos fenolicos	Oshima-Franco et al., (2005)
Extrato aquoso das folhas	-	Cavalcante et al. (2007)
Extrato metanólico das folhas	Rutina	Cintra-Francischinelli et al., (2008)
Extrato hidroalcóolico das folhas	-	Raslan et al., (2002)
Extrato aquoso das folhas	Ácido elágico	Da Silva et al., (2008b)

- Os autores não identificaram ou não sugeriram compostos responsáveis pela atividade.

Tabela 5. Atividades antifúngica, antiprotozoária, bactericida e antiviral

Atividade farmacológica	Extrato/Parte da planta	Compostos responsáveis	Referência bibliográfica
Bactericida e antiviral	Extrato fluido das folhas	-	Camargo et al., (1993)
	Extrato alcoólico das folhas	-	Cury (2005)
	Óleo essencial das folhas	-	Tavares et al., (2008)
	Extrato fluido das folhas	-	Arantes (2002)
	Extrato etanólico, aquoso e óleo essencial das folhas	Flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos e alcalóides	Guntzel (2008)
	Óleo essencial das folhas	β-pineno	Schneider et al., (2006)
	Extrato hidroalcóolico e infusão das folhas	-	Weckwerth et al., (2008)
	Óleo essencial das folhas	-	Godoi (2013)
	Extrato hidroalcóolico das folhas	Cumarinas, flavonóides e diterpenos clerodânicos	Espinosa et al., (2015)
	Extrato hidroalcóolico das folhas e do óleo essencial	Sesquiterpenos	Cavalheiro (2016)
	Extrato etanólico das folhas	Compostos Fenólicos	Marques (2013)
Antifúngica	Extrato metanólico	Casearinas	Oberlies et al., (2002)
	Extrato etanólico das folhas	Ácido gálico	Da Silva et al., (2008)
	Extrato hidroalcóolico das folhas	-	Lopes et al., (2010)
Antiprotozoária	Extrato hexânico da casca da raiz	Diterpeno clerodânicos	Espindola et al., (2004)
	Extratos hexânicos das folhas, das cascas de tronco e cascas das raízes	Diterpeno clerodânicos	Mesquita et al., (2005)
	Extratos hexânicos das folhas, madeira e casca das raízes e caules	Diterpeno clerodânicos	Mesquita et al., (2007)
	Extratos etanólicos das folhas	Flavonoides e taninos	Slomp (2007)
	Óleo essencial das folhas	Casearinas	Bou et al., (2013)
Larvicida	Extrato hexânico do tronco e da casca do tronco	-	Rodrigues et al., (2006)

- Os autores não identificaram ou não sugeriram compostos responsáveis pela atividade.

Tabela 6. Demais atividades testadas para *C. sylvestris*

Atividades farmacológicas	**Extrato/Parte da planta**	**Compostos responsáveis**	**Referência bibliográfica**
Abortivo	Extrato aquoso das folhas	-	Silva et al. (1986)
Genotóxicidade	Extrato etanólico das folhas	-	Maistro et al., (2004)
Imunomodulador	Extrato hexânico dos galhos	-	Napolitano et al., (2005)
Anticlastogênica	Óleo essencial das folhas	Sesquiterpenos e monoterpenos	Sousa et al., (2007)
Proteção de DNA	Extrato etanólico das folhas	Casearina X	Prieto et al., (2012)
	Extrato etanólico das folhas	Casearina B	Prieto et al., (2013)
Hipotrigliceridemiante	Extrato hidroalcóolico das folhas	-	Werle et al., (2009)
	Extrato metanólico das folhas	-	Schoenfelder et al., (2008)
	Extrato metanólico	Taninos, antocianinas, flavonóides, catequinas, chalconas, auronas, saponinas, triterpenos	Brant et al., (2014)
Antioxidante	Extrato etanólico das folhas	Casearinas	Araújo et al., (2015)
Cicatrizador	Decocto das folhas	-	Alves et al., (2016)

- Os autores não identificaram ou não sugeriram compostos responsáveis pela atividade.

2.3 *SEDUM DENDROIDEUM*

S. dendroideum (Fig. 5), popularmente conhecida como bálsamo, é usado como planta ornamental e também na medicina popular contra úlceras gástricas e processos inflamatórios gerais (LORENZI e SOUZA, 2001). Segundo Lorenzi e Souza (1995), *S. dendroideum* pertence à família Crassulaceae, gênero *Sedum*, espécie: *S. dendroideum* [synonym.: *S. praealtum* e *S. dendroideum* ssp]. É uma planta suculenta e subarbustiva, e produz flores amarelas. Trata-se de uma espécie perene, sublenhosa e xerófita,

originária da África do Sul, de clima tropical seco (LORENZI e SOUZA, 1995; EPAGRI, 1998).

Entre as espécies de *Sedum*, *S. dendroideum* é bem apreciada por suas propriedades medicinais. O bálsamo é largamente utilizado na medicina tradicional para tratar inflamações de pele, contusões e problemas gástricos, em razão das ações emoliente e cicatrizante, sendo consumido através de sucos ou ingestão das folhas *in natura*.

Duarte e Zanetti (2002) descrevem morfologicamente o *S. dendroideum*. Segundo os autores, tem em média 1 m de altura. Suas folhas, com aproximadamente 1 a 5 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura, são alternas, simples, sésseis, glabras, brilhantes e discolores, apresentando a face abaxial com tonalidade verde mais clara. Têm formato oboval, levemente assimétrico, com ápice obtuso, base decurrente e margem lisa, sendo apenas a nervura central aparente.

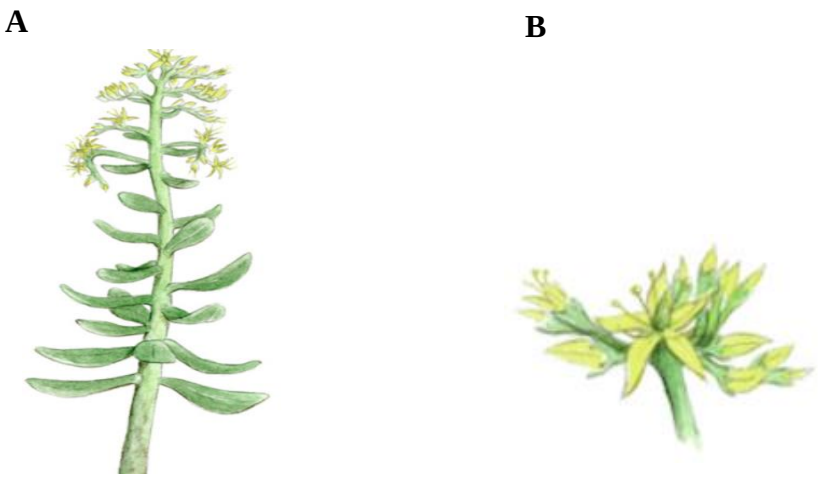


Figura 5. (A) *Sedum dendroideum*; (B) Flores de *Sedum dendroideum*. Fonte: Grandi, 2014.

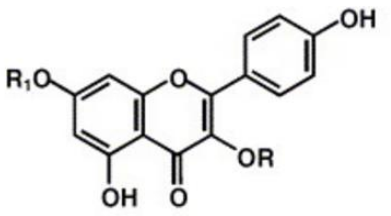
A presença de metabólitos secundários (flavonóides, flavonóides glicosilados, e triterpenoides) em plantas do gênero *Sedum* (Crassulaceae) já foi descrita (NIEMANN et al., 1976; WOLBIŚ, 1989; STEVENS et al., 1996; MULINACCI et al., 1995;

BENSOUICI et al., 2016). Estudos com este gênero, já evidenciaram as atividades anti-inflamatória das folhas de *S. praealtum* e *S. telephium* (CAMARGO et al., 2002; SENDL et al., 1993), efeitos antimicrobianos relatados para *S. aizoon e S. Tatarinowii* (HU e XU, 2012).

2.3.1 Constituintes químicos e atividades farmacológicas de *S. dendroideum*

Metabolitos secundários já foram relatados para *Sedum dendroideum* (Fig. 5), sendo estes fenóis, taninos e flavonóides com esqueleto de kaempferol e derivados de quercetina (De MELO et al., 2005; De MELO et al., 2009; CARRASCO, 2014).

A



B

Flavonóide	R	R_1
1	Rha	Rha
2	Glc	Rha
3	Di	Rha
4	Di	Glc
5	H	Rha
6	Rha	H
7	H	H
8	Di	Glc
9	Di	Rha
10	Rha	Rha
11	Glc	Rha

Figura. 6 Estrutura química de flavonóides isolados das folhas de *Sedum dendroideum*. (A) Estrutura geral; (B) Respectivos substituintes: Rha: ramnonose; Glc: glucose; Di: Rha(1→2)Glc. Fonte: Adaptação de De Melo et al., 2005; De Melo et al., 2009.

Estudos com esta espécie evidenciaram atividades antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas frescas (MALVAR et al., 2004; MELO et al., 2005), potencial antimicrobianoo do extrato hidroalcóolico das folhas (MARQUES 2015), efeito inibidor sobre a motilidade de espermatozoides humanos, atividade antifertilização em ratos e,

atividade espermicida dos extratos etanólicos das folhas (SILVA-TORRES et al., 2003; GARCIA-PINEDA et al., 1986).

O uso de extratos das folhas de *S. dendroideum* como agentes antiulcerogênicos têm se mostrado eficaz. Carrasco (2014), investigou os efeitos antiulcerogênicos do extrato hidroalcoólico das folhas, mostando redução das lesões gastricas agudas e crônicas em até 70,8% e 92,9% respectivamente. Gaspi et al., (2015) demonstraram o potencial antiulcerogênico, do extrato hidroalcóolico do sumo foliar, no tratamento de úlceras pépticas. O extrato reduziu as lesões agudas induzidas por etanol em até 88%.

Ao contrário de *C. sylvestris*, há poucos trabalhos que relatam atividades farmacológicas de *S. dendroideum*, logo, é possível observar que esta planta não recebeu muita atenção em relação à sua composição fitoquímica de metabólitos secundários e primários, os quais poderiam corroborar com os conhecimentos populares a respeito do seu uso. Plantas medicinais podem ser utilizadas como alimentos e medicamentos, separadamente ou num mesmo ato, como o bálsamo, onde as folhas são ingeridas como salada para tratar úlceras (SÁ, 2008). Polissacarídeos são consumidos quando plantas são ingeridas como alimento ou quando as mesmas são usadas na preparação de chás, uma vez que alguns podem ser facilmente obtidos por extração em água quente.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificando a importância medicinal da *Casearia sylvestris*, do *Sedum dendroideum* e dos polissacarídeos, este trabalho teve como objetivo isolar, purificar e caracterizar estruturalmente polissacarídeos destas plantas, além de avaliar propriedades farmacológicas destas moléculas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e purificar os polissacarídeos dos extratos aquosos das folhas da *Casearia sylvestris* e *Sedum dendroideum*;
- Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos isolados;
- Avaliar a atividade antiúlcera gástrica *in vivo* de frações polissacarídicas isoladas destas plantas;
- Investigar a ação imunomoduladora dos polissacarídeos obtidos do extrato aquoso das folhas de *Sedum dendroideum*, em modelo *in vitro*, utilizando células THP-1 diferenciadas em macrófagos.
- Gerar resultados que comprovem cientificamente os usos populares destas plantas.

ARTIGO I

Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharides obtained from infusion of *Sedum dendroideum leaves*

Publicado na International Journal of Biological Macromolecules

Chemical structure and anti-inflamatory effect of polysaccharides obtained from infusion of *Sedum dendroideum leaves*

Ana Flávia de Oliveira [a], Geórgia Erdmann do Nascimento [a], Marcello Iacomini [a], Lucimara Mach Côrtes Cordeiro [a], Thales Ricardo Cipriani [a,*]

[a] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil*

* Corresponding author. Tel: +55 41 3361 1655; E-mail address: trcipriani@ufpr.br (T. R. Cipriani).

Abstract

Sedum dendroideum is popularly known as balsam and used for treatment of inflammatory disorders. Two polysaccharides (RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5) were isolated from infusion of its dried leaves, using dialysis at 100 kDa cut-off membrane and anion exchange chromatography. Methylation and NMR analyzes showed that RSBAL-H_2O is a highly methyl-esterified homogalacturonan, constituted by (1→4)-α-D-GalA residues, whereas RSBAL-0.5 is a highly methyl-esterified homogalacturonan, branched at O-3 by type II arabinogalactan and arabinan side chains. In this study is showed that these balsam polysaccharides stimulates secretion of the cytokines TNF-α, IL1-β and IL-10 by THP-1 macrophages, acting as immunostimulatory agents. But, on the other hand, they reduce TNF-α and IL1-β secretion induced by a pro-inflammatory agent (LPS), showing anti-inflammatory effect.

Keywords: *Sedum dendroideum*, polysaccharides, cytokines.

1. Introduction

Sedum (Crassulaceae family) is a large genus, with many species used pharmaceutically. *Sedum* species have showed spermicide [1], antioxidant, anticholinesterase, antibacterial [2] and anti-inflammatory activities [3].

Sedum dendroideum is a subshrub succulent plant, originally from semi desert areas of Africa, and acclimated in various parts of the world. In Brazil it is popularly known as balsam and used in folk medicine to treat gastric ulcers and general inflammatory processes [4]. Extracts of *S. dendroideum* are popularly used to treat ulcers, inflammation disturbances and wounds [5]

Previous studies have showed different pharmacological activities for extracts of *S. dendroideum*, as antiulcer [6], antinociceptive, anti-inflammatory [7,5,8], contraceptive [9,10], antidiabetic [11,12], and antibiotic [13].

The medicinal properties attributed to *S. dendroideum* are associated with its secondary metabolites, mainly flavonoids, flavonoid glycosides, phenols, tannins and cyanogenic compounds [7,6,14,15]. However, when *S. dendroideum* is popularly used in the form of tea (infusion or decoction) or as a juice made from its leaves, other chemical compounds, such as polysaccharides, are also ingested. Among other properties, polysaccharides may have antiulcer [16,17], antinociceptive, anti-inflammatory [18,19,20,21], antioxidant, and anticancer activities [22,23]. Thus, polysaccharides could contribute for the medicinal properties of *S. dendroideum*.

THP-1 cell line is widely used for studying functions or responses of monocytes and macrophages and the effects that external stimuli exert on them [24]. The inflammation process is mediated by cytokines such as TNF-α and IL-1β, which play major roles in the initiation and amplification of inflammatory processes [25]. Considering the medicinal importance of polysaccharides and *S. dendroideum*, this study

reports the isolation and structural characterization of *S. dendroideum* polysaccharides, and their influence on the TNF-α, IL-1β and IL-10 secretion, by THP-1 macrophages.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

S. dendroideum was obtained in Campina Grande do Sul, State of Paraná (PR), Brazil, in December 2013. The plant was identified in the Municipal Botanical Museum of Curitiba, State of Paraná (PR), Brazil. Carboxyl-reduction of polysaccharides (5 mg) was carried out using three successive cycles of the 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide method [26], to give carboxyl-reduced polysaccharide fractions. Sodium borohydride was used as reducing agent.

2.2. General analytical methods

All extracts were evaporated at <60 ºC under reduced pressure. Centrifugation was at 8,000 rpm, at 10 ºC, for 10 min.

2.3. Extraction and fractionation of polysaccharides from S. dendroideum leaves

Freeze-dried *S. dendroideum* leaves (1.25 kg) were submitted to extraction with H_2O (100 g/L) by infusion in boiling water. After adding water, the material was lightly stirred and allowed to rest until cooling. The aqueous extracts were combined, filtered, concentrated to a small volume (300 mL), and added to cold ethanol (900 mL). The resulting precipitate was separated by centrifugation, dissolved in H_2O, dialyzed at a 6-8 kDa cut-off membrane against running water for 2 days and freeze-dried, to give the crude polysaccharide fraction (11.3 g). This fraction was dissolved in H_2O (200 mL) at room temperature, and submitted to freeze-thawing process [27], resulting in insoluble (PBAL) and soluble (SBAL) fractions. SBAL was dialyzed at a 100 kDa cut-off membrane to give

a retained (RSBAL) and an eluted (ESBAL) fraction. RSBAL (100 mg) was then submitted to anion exchange chromatography, using a column with 25 mL of DEAE-Sepharose Fast Flow (10 x 2.1 cm, height x i.d.), with sequential elution by H_2O and 0.5 M sodium chloride, until no carbohydrates were detected by the phenol-sulfuric method [28], to give the fractions RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5. RSBAL-0.5 was dialyzed against distilled water at a 6-8 kDa cut-off membrane to remove the salt. All fractions obtained were freeze-dried.

2.4. HPSEC analysis

Homogeneity and average molar mass (M_w) of the polysaccharides were determined by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). The analyses of the samples were performed on a Waters chromatograph equipped with four Ultrahydrogel columns connected in series (2000, 500, 250, 120; with exclusion sizes of 7×10^6, 4×10^5, 8×10^4, and 5×10^3 Da respectively) and attached to a multi detection system, which consisted of a Waters 2410 differential refractometer (RI). The eluent was 0.1 M aq. sodium nitrite containing 0.5 g/L sodium azide, at 0.6 mL/min. The samples, at a concentration of 1 mg/mL, previously filtered through a membrane (0.22 μm), were injected (100 μL loop), and analyzed at 25 ºC. The specific refractive index increment (*dn*/*dc*) was determined using the same equipment with the columns uncoupled. Samples at concentrations of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mg/mL, previously filtered through a membrane (0.22 μm), were injected (500 μL loop) and analyzed at 25 °C using the RI detector only. The eluent was the same described above. Results were analyzed using the Wyatt Technology ASTRA software, version 4.70.07.

2.5. Monosaccharide analysis

The polysaccharides (2 mg) were hydrolyzed with 1 M trifluoroacetic acid (1 mL) at 100 ºC for 16 h, the solution was then evaporated, and the residue dissolved in H_2O (500 µL). The resulting monosaccharide mixture was examined by silica-gel 60 thin layer chromatography (TLC; Merck), the plates being developed with ethyl acetate:acetic acid:1-propanol:water (4:2:2:1 v/v) and stained with orcinol-sulfuric acid at 100 °C [29]. The hydrolyzate was also treated with sodium borohydride (2 mg) and, after 18 h, acetic acid (0.5 mL) was added for neutralization, the solution evaporated to dryness and the resulting boric acid removed as trimethyl borate by co-evaporation with methanol. Acetylation was carried out with acetic anhydride-pyridine (1:1 v/v, 0.5 mL) at room temperature for 18 h, and the resulting alditol acetates were extracted with chloroform. These were analyzed by GC-MS (Varian Saturn 1000 gas chromatograph coupled to a ion-trap mass spectrometer), using a DB1-MS column (30 m x 0.25 mm i.d.) programmed from 100 to 220 ºC at 5 ºC/min and 220 to 280 ºC at 5 ºC/min, with He as carrier gas at 1 mL/min. Components were identified by their typical retention times and electron impact spectra, compared to alditol acetates prepared from standard monosaccharides (Sigma-Aldrich). The results were given as mol%, calculated according to Pettolino et al. [30]. Uronic acid contents of polysaccharides were determined using the colorimetric *m*-hydroxybiphenyl method [31].

2.6. Methylation analysis

The polysaccharides (5 mg) were per-*O*-methylated according to the method of Ciucanu and Kerek [32], using powdered sodium hydroxide in dimethyl sulfoxide and methyl iodide. The product was hydrolyzed with 0.5 mL of 72% sulfuric acid (w/v) for 1 h at 0 ºC, followed by addition of H_2O (4.0 mL) and heating at 100 ºC for 16 h. The

hydrolyzates were neutralized with barium carbonate, filtered, then reduced with sodium borohydride (2 mg) and acetylated as described above to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates. These were analyzed by GC-MS using the same conditions as described for alditol acetates. They were identified by their typical retention times and electron impact spectra, compared to partially *O*-methylated alditol acetates according to Sassaki et al. [33]. The results were given as mol%, calculated according to Pettolino et al. [30].

2.7. NMR analysis

$^{1}H/^{13}C$ HSQC-DEPT analyses were performed in a 400 MHz Bruker model Avance III spectrometer with a 5 mm inverse probe, at 70 °C in D_2O or 0.1 M deuterated sodium hydroxide. Chemical shifts (δ) were expressed in ppm relative to acetone, at δ 30.2/2.22 ($^{13}C/^{1}H$). The degree of methyl-esterification was determined by integration of the cross peak volumes of C-5/H-5 of 6-*O*Me-α-D-Gal*p*A and α-D-Gal*p*A units on HSQC experiment, while the acetylation degree was determined using the integration of the H-1 areas of the 6-OMe-D-Gal*p*A and α-D-Gal*p*A units, with of the hidrogen of acetyl groups in the ^{1}H-NMR spectrum according to Nguyen et al. [34].

2.8. Cell line

THP-1 cells (human acute monocytic leukemia cell line) were maintained in RPMI 1640 liquid culture medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal calf serum, streptomycin (100 µg/mL) and penicillin (100 U/mL), at 5% CO_2, at 37 ºC.

2.9. Differentiation of THP-1 cells

The mature macrophage-like state was induced by treating THP-1 cells (2 x 10^5 cells/mL) for 48 h with 5 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), in 24-wells polystyrene tissue culture plates with 1 mL cell suspension in each well. After differentiation, cells adhered to the surface allowing removal of the culture medium with PMA. The wells were then washed twice with PBS (phosphate buffered saline), and new medium, PMA free, was added. The THP-1 macrophages (differentiated cells) were incubated for 24 h at 5% CO_2, at 37 ºC, for rest.

2.10. Cytotoxicity assay

Metabolic activity of THP-1 macrophages was evaluated by MTT (3,4,5-dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium) assay. The culture medium of THP-1 macrophages was removed and replaced with fresh medium containing polysaccharide fractions (RSBAL-H_2O or RSBAL-0.5) at different concentrations (2, 10, and 50 µg/mL) or PBS (50 µL). The cells were then incubated for 24 h at 5% CO_2, at 37 ºC. Three hours before completing those 24 h, MTT (20 µL; at 5 mg/mL) was added. After 3 h of incubation, unreacted MTT was removed, formazan crystals were solubilized in DMSO (100 µL/well), and optical density was evaluated in microplate reader at 570 nm.

2.11. Treatment of THP-1 macrophages with polysaccharides and quantification of TNF-α, IL-1β and IL-10

The culture medium of THP-1 macrophages was removed and replaced with fresh medium containing polysaccharide fractions (RSBAL-H_2O or RSBAL-0.5) at different concentrations (2, 10, 50 µg/mL), or PBS (50 µL), or lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/mL) from *Escherichia coli*, 0111:B4 (Sigma), as negative and pro-inflammatory controls

respectively. The cells were then incubated for 18 h at 5% de CO_2, a 37 ºC. According to Chanput et al. [35], a maximal secretion of cytokines by THP-1 macrophages occurs in 18 h, on LPS-induced inflammation. The supernatants were collected and the pro-inflammatory (TNF-α, IL-1β) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines quantified by ELISA (eBioscience kits), according to the manufacturer's instructions.

2.12. Statistical analysis

The results are expressed as mean ± standard error of the mean of triplicate cultures. Each concentration was tested in quintuplicate. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Data were considered different at a significance level of $p < 0.05$. The graphs were drawn and the statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.01 for Windows.

3. Results and discussion

3.1. Fractionation and structural analysis of the polysaccharides

Polysaccharides were obtained from infusion of *S. dendroideum* leaves and were fractionated according to Fig. 1. The soluble fraction obtained after the freezing-thawing process (SBAL; 4.1 g) presented two peaks in HPSEC-RI analysis (Fig. 2A). It was then fractionated by dialysis at a 100 kDa cut-off membrane, resulting in a retained (RSBAL; 62%) and an eluted fraction (ESBAL; 38%), which showed HPSEC-RI elution profiles containing a single peak (Fig. 2A).

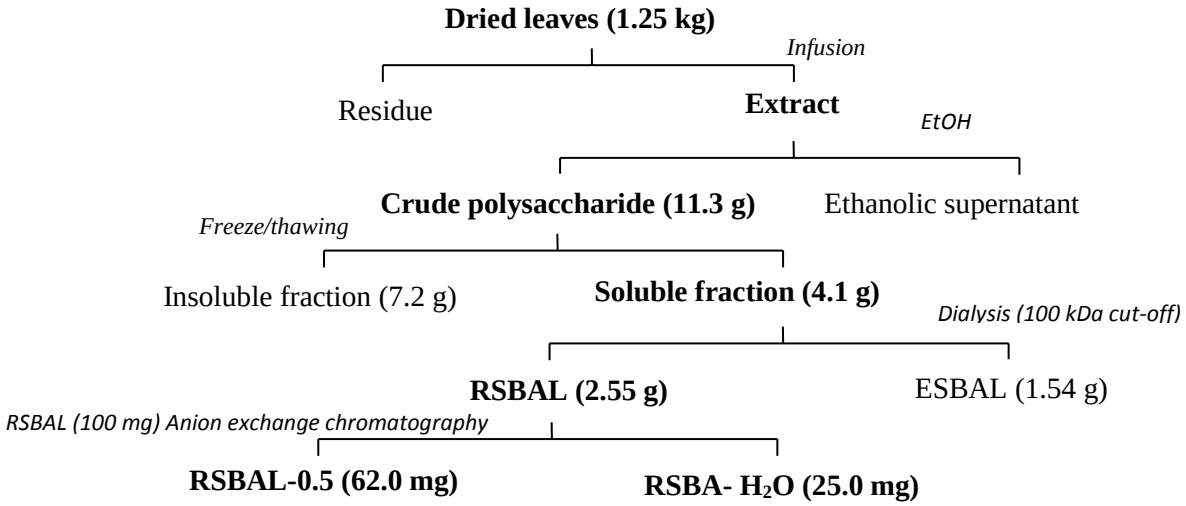


Fig 1. Flowchart of the extraction and fractionation process of polysaccharides from *Sedum dendroideum* leaves.

The main fraction (RSBAL) contained uronic acid, rhamnose, arabinose, galactose and glucose in a 31:3:2:3:1 molar ratio. TLC analysis of the monosaccharide mixture obtained by acid hydrolysis of RSBAL indicated the presence of galacturonic acid. Galacturonic acid residues are usually present in two kinds of pectic polysaccharides, namely homogalacturonan and rhamnogalacturonan. In pectic polysaccharide fractions there is frequently the presence of neutral structures like arabinans, galactans and arabinogalactans, which can be covalently attached to the acidic polysaccharide [36,37].

To confirm that the neutral components are linked to the acidic polysaccharide, RSBAL (100 mg) was submitted to anion exchange chromatography. Two fractions were obtained: one eluted with H_2O (RSBAL-H_2O; 25%) and another eluted with 0.5 M sodium chloride (RSBAL-0.5; 62%). Thus, although RSBAL eluted as a single peak in HPSEC, the anion exchange chromatography showed that RSBAL is constituted by two different polymers. Both RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5 showed HPSEC-RI elution profiles containing a single peak (Fig. 2B).

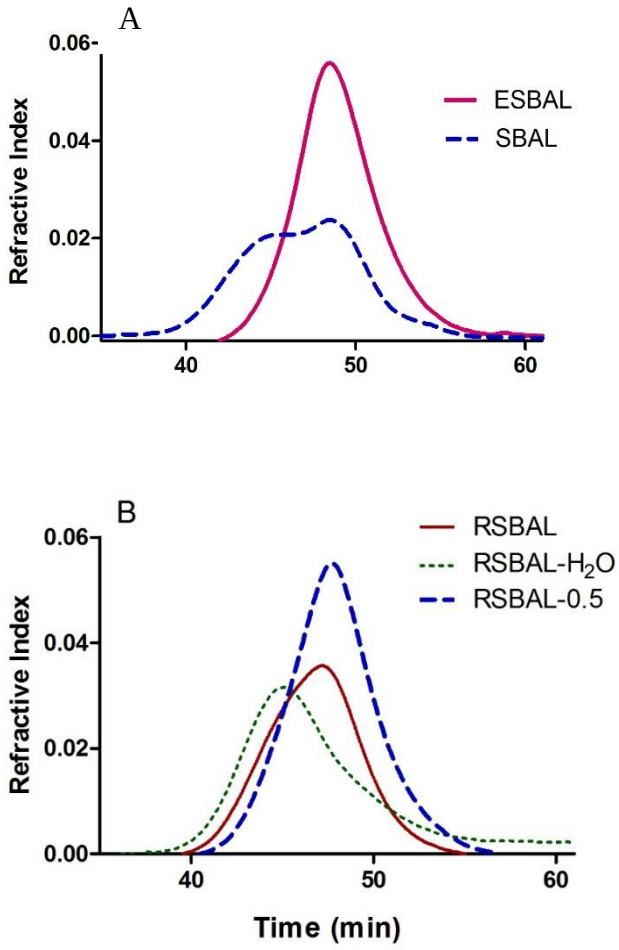


Fig 2. HPSEC-RI elution profiles of (A) SBAL and ESBAL; (B) RSBAL, RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5.

RSBAL-H_2O had a M_w of 54,700 g/mol (*dn*/*dc* = 0.132), and contained galacturonic acid, rhamnose, arabinose, galactose and glucose in a 57:1:1:2:1 molar ratio. Despite the high content of galacturonic acid, the elution of RSBAL-H_2O with H_2O in an anion exchange chromatography could be explained by the presence of methyl-ester groups, which are commonly present in homogalacturonans and rhamnogalacturonans [36,37]. Methyl-ester groups prevent the interaction of the polysaccharide with the anion exchange resin.

HSQC-DEPT of RSBAL-H_2O (Fig. 3A) showed $^{1}H/^{13}C$ correlations at δ 99.2/5.11 (C-1/H-1), 68.6/3.70 (C-2/H-2), 69.3/4.01 (C-3/H-3), 78.1/4.45 (C-4/H-4) and 71.8/4.71 (C-5/H-5) of α-1,4-linked D-Gal*p*A units [21,20]. Besides, a $^{1}H/^{13}C$ correlation at 49.3/3.38, of methanol, was also observed. Due to its low D_2O solubility, RSBAL-H_2O

was solubilized in 0.1 M deuterated sodium hydroxide for NMR analysis. In this alkaline condition, the $–CO_2$-CH_3 groups of galacturonic acid residues were de-esterified, forming methanol. The presence of a low amount of free carboxyl groups in RSBAL-H_2O could justify its elution with water, in an anion exchange chromatography. Thus, these results suggested that RSBAL-H_2O is constituted by a highly methyl-esterified homogalacturonan.

RSBAL-0.5 had a *M*w of 85,700 g/mol (*dn*/*dc* = 0.165), and contained galacturonic acid, rhamnose, arabinose, galactose and glucose in a 18:1:7:6:1 molar ratio. Methylation analysis of the neutral structures of RSBAL-0.5 (Table 1) showed the presence of 3-, 5-, and 3,5-linked Ara*f* units, in accordance with the formation of alditol acetates of 2,5-Me_2-Ara (3.7%), 2,3-Me_2-Ara (11.5%) and 2-Me-Ara (2.5%) respectively, suggesting the presence of arabinan. Moreover, 3,6- and 3,4,6-linked Gal*p* units were observed, as demonstrated by the presence of alditol acetates of 2,4-Me_2-Gal (18.4%) and 2-Me-Gal (13.0%), suggesting the presence of type II arabinogalactan in RSBAL-0.5 [30,37]. Non-reducing end-units of arabinose (46.1%) and galactose (4.8%) were also observed. Partially *O*-methylated alditol acetates derivatives of uronic acids are less volatile and resistant to analysis by GC-MS. Thus, to determine the substitution profile of the galacturonic acid residues in RSBAL-0.5, this fraction was submitted to carboxyl-reduction prior to methylation analysis, which showed the appearance of 2,3,6-Me_3-Gal (54.6%) and 2,6-Me_2-Gal (4.5%) (Table 1). This result indicated that 4- and 3,4-linked Gal*p*A residues are present in RSBAL-0.5, which suggests that this fraction is a homogalacturonan branched at O-3, probably by side chains of arabinans and type II arabinogalactans.

Table 2 Profile of partially O-methylated alditol acetates and monosaccharide structures of native and carboxyl-reduced RSBAL-05.

***O*-Me-alditol acetate**	**Linkage**	**RSBAL-0.5 Mol %**	
		Native	**Carboxyl-reduced**
2,3,5-Me_3-Ara*f*	Ara*f*-(1→	46.1	22.5
2,5-Me_2-Ara*f*	→3)-Ara*f*-(1→	3.7	-
2,3-Me_2-Ara*f*	→5)-Ara*f*-(1→	11.5	-
2-Me-Ara*f*	→3,5)-Ara*f*-(1→	2.5	-
2,3,4,6-Me_4-Gal*p*	Gal*p*-(1→	4.8	10.1
2,3,6-Me_3-Gal*p* (1)	→4)-Gal*p*A-(1→	-	54.6
2,6-Me_2-Gal*p* (1)	→3,4)-Gal*p*A-(1→	-	4.5
2,4-Me_2-Gal*p*	→3,6)-Gal*p*-(1→	18.4	3.2
2-Me-Gal*p*	→3,4,6)-Gal*p*-(1→	13.0	5.1

(1) Derivatives that appeared after carboxyl-reduction. Uronic acids after carboxyl-reduction was < 2%.

Arabinans and arabinogalactans are frequently linked to O-4 of Rha*p* residues of type I rhamnogalacturonans, which can be interspersed with homogalacturonans, according to Pettolino et al. [30], Popov et al. [40], Carpita and Gibeuat [36], Lerouge et al. [41], Renard et al. [42], Mohnen [37]. However, the low amount of Rha*p* residues in RSBAL-0.5 and the absence of 4-*O*-substituted Rha units according to the methylation analysis corroborate that the arabinans and type II arabinogalactans chains branch the homogalacturonan in its O-3 position. Some homogalacturonans branched at O-3 position have been described, for example, the pectic polysaccharide GOA2 from *Glinus oppositifolius* [38], and the apple pectin [39].

HSQC-DEPT of RSBAL-0.5 (Fig. 3B) showed $^{1}H/^{13}C$ correlations at δ 99.9/4.95 (C-1/H-1), 78.7/4.45 (C-4/H-4), 70.6/5.08 (C-5/H-5) and 52.7/3.80 (–CO_2-$\underline{CH}_3$) typical of α-1,4-linked 6-*O*Me-D-Gal*p*A units [16,20,40], and at δ 99.2/5.12 (C-1/H-1),

78.7/4.45 (C-4/H-4) and 71.1/4.77 (C-5/H-5) of non-methyl-esterified α-1,4-linked D-Gal*p*A units [20,40,42]. According to integration of the cross peak volumes of C-5/H-5 of 6-*O*Me-D-Gal*p*A and D-Gal*p*A units on HSQC experiment, the degree of methyl-esterification was 74%, and to integration of the H-1 cross-peak volumes of 6-OMe-D-Gal*p*A, D-Gal*p*A units and the acetyl group, acetylation degree determined was 12.9%. These signals of acetyl groups were observed at δ 20.4/2.09 [16,20]. They can be present in homogalacturonans and rhamnogalacturonans, frequently substituting Gal*p*A units at O-2 or O-3 [36,37,40].

HSQC-DEPT of RSBAL-0.5 (Fig. 3B) also showed $^{1}H/^{13}C$ correlations of C-1/H-1 at δ 109.1/5.24 and 108.1/5.42 of α-L-Ara*f* units, and correlations of C-1/H-1, C-3/H-3 and C-6/H-6 of 3,6-linked β-D-Gal*p* units at δ 103.1/4.50, 80.2/3.85 and 69.5/4.06 respectively [16,20,43].

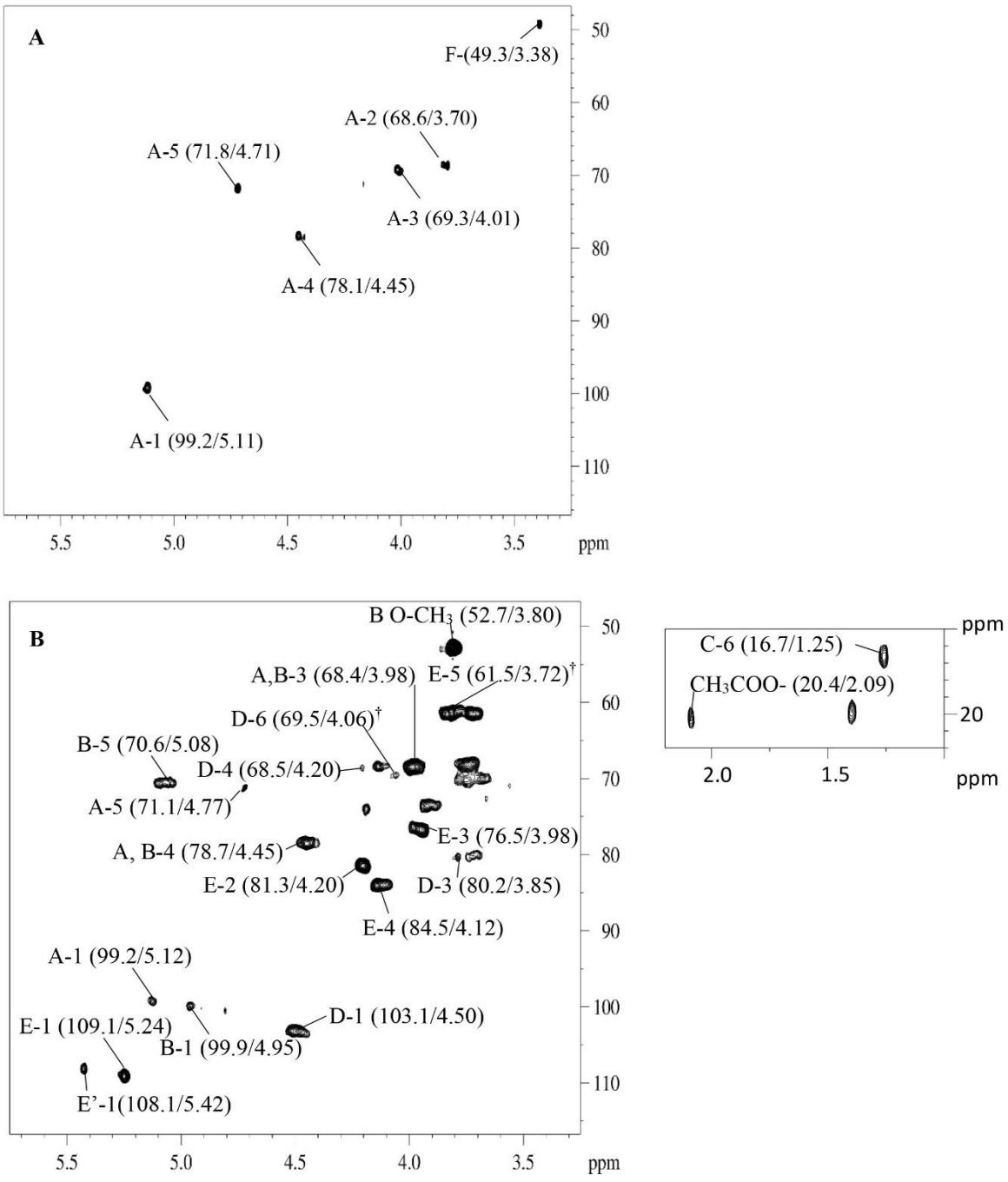


Fig 3. HSQC-DEPT correlation map of RSBAL-H_2O (A) and RSBAL-0.5 (B). Solvents were NaOD 0.1M and D_2O respectively; at 70 ºC; numerical values are in δ ppm. A (α-D-Gal*p*A), B (6-OMe-α-D-Gal*p*A), C (α-L-Rha*p*), D (β-D-Gal*p*), E and E' (α-L-Ara*f*), and F (Methanol). The letters are followed by the carbon number of the monosaccharide unit. † Inverted signals representing C-6/H-6.

The results obtained from NMR analysis confirmed the methylation data, indicating that RSBAL-0.5 is a high methyl-esterified homogalacturonan branched by side chains of arabinans and type II arabinogalactans.

The minor sugar components of RSBAL-0.5, rhamnose and glucose, were not identified in the methylation analysis. Rhamnose is generally present interspersed with Gal*p*A units in pectic polysaccharides [36,37], and glucose is probably from traces of starch.

3.2. Immunostimulatory activity of RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5

Immunostimulatory activity of *S. dendroideum* polysaccharides was evaluated through analysis of cytokines secretion (TNF-α, IL1-β and IL-10) by macrophage-differentiated THP-1 cells. TNF-α and IL1-β are pro-inflammatory cytokines, while IL-10 is an anti-inflammatory cytokine. RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5 at 2, 10 and 50 µg/mL were not toxic to THP-1 macrophages according to MTT assay (Fig. 4).

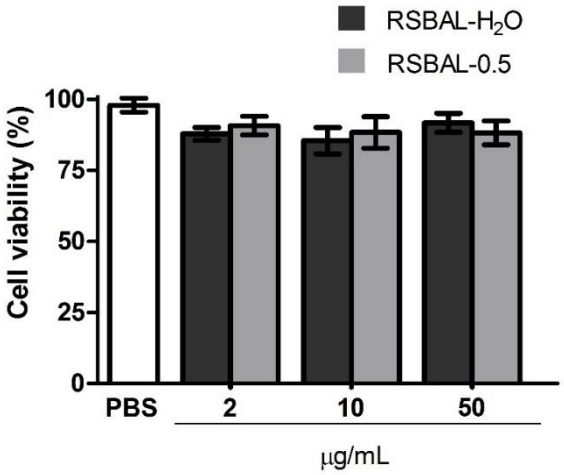


Fig 4. Viability of THP-1 macrophages exposed for 24 h to RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5, determined by MTT assay.

Both RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5 stimulated cytokines secretion by THP-1 macrophages in a dose dependent way at 2, 10 and 50 µg/mL (Fig. 5 and Fig. 6 respectively). As expected, LPS (1 µg/mL) also induced cytokines secretion. However, when THP-1 macrophages were simultaneously incubated with LPS (1 µg/mL) and polysaccharides (50 µg/mL), TNF-α and IL1-β secretion was lower than when incubated with LPS (1 µg/mL) only (Fig. 5 and Fig. 6), indicating that the polysaccharides RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5 have anti-inflammatory effect when in the presence of a pro-inflammatory agent as LPS. On the other hand, IL-10 secretion was not influenced by the presence of polysaccharides together with LPS.

The ratio between pro-inflammatory (TNF-α and IL-1β) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines induced by LPS alone and by LPS plus polysaccharides was calculated. The ratios TNF-α/IL-10 and IL-1β/IL-10 with LPS were 25.0 and 19.6 respectively, while for LPS plus RSBAL-H_2O, they were 20.1 and 6.5, and for LPS plus RSBAL-0.5, were 22.7 and 6.0 respectively. The lower ratio of pro-/anti-inflammatory cytokines by the LPS-stimulated THP-1 macrophages, in the presence of RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5, demonstrated anti-inflammatory effect of these polysaccharides.

These results suggest that, although the polysaccharides from *S. dendroideum* induce secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-1β), when the assay is performed in the presence of LPS, the presence of the polysaccharide reduces the secretion of them, reaching an anti-inflammatory result. This characteristic is also observed for other polysaccharides which have both pro-inflammatory and anti-inflammatory effects and, therefore, an immunomodulatory activity [44,45,46,47,48].

From the results obtained in this study it is possible suggest that polysaccharides could contribute for the anti-inflammatory properties of *S. dendroideum* extracts,

justifying the popular use of this plant to treat ulcers, inflammation disturbances and wounds.

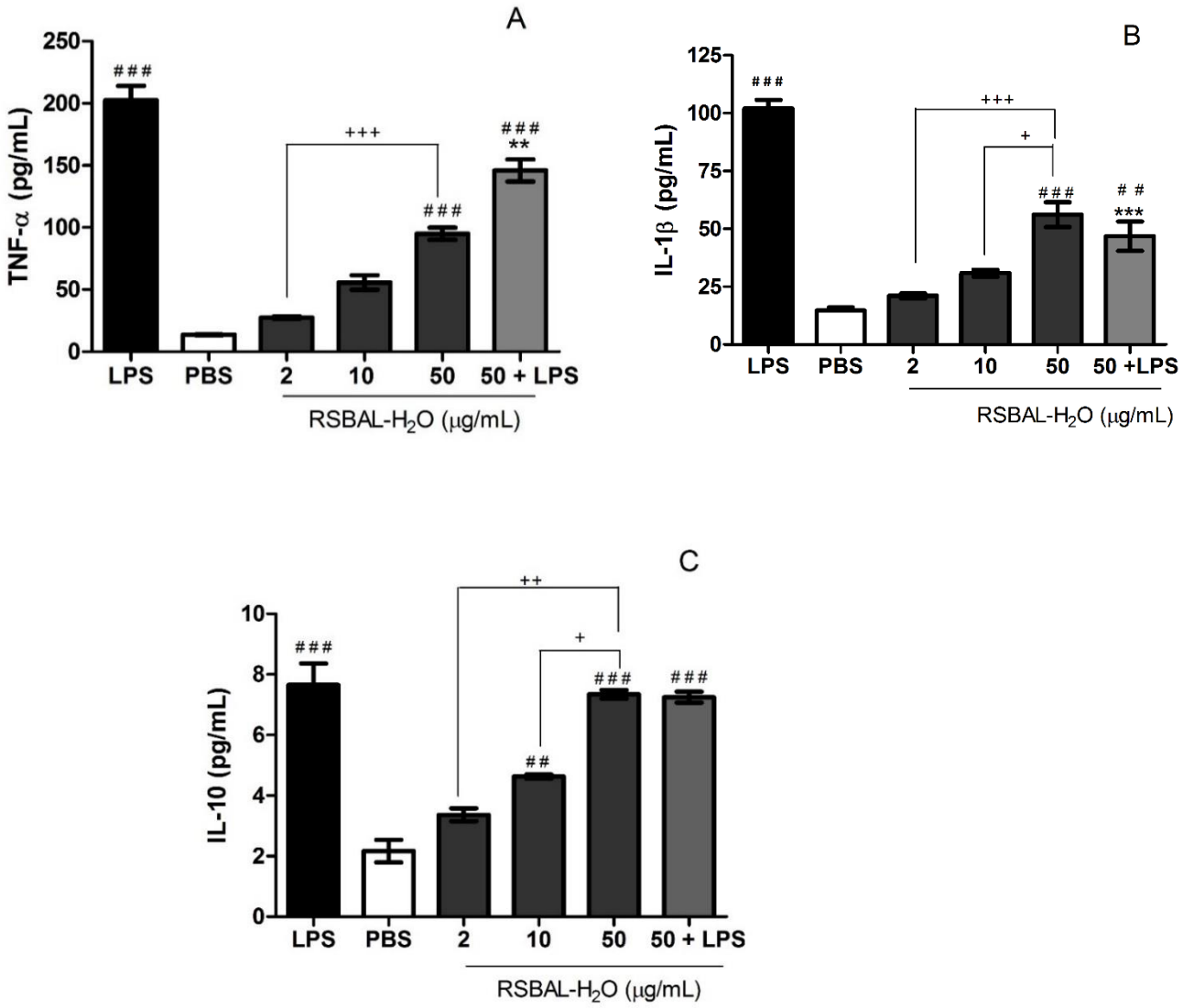


Fig 5. Ability of RSBAL-H_2O to stimulate the secretion of TNF-α (A), IL-1β (B) and IL-10 (C) by THP-1 macrophages. Cells were incubated with LPS (1 µg/mL), PBS, RSBAL-H_2O (2, 10 and 50 µg/mL), or RSBAL-H_2O + LPS (50 µg/mL + 1 µg/mL respectively). Statistical difference in comparison with LPS group (*), PBS group (#), and between the polysaccharide concentrations (+). $p < 0.05$ (#), $p < 0.01$ (# #) and $p < 0.001$ (# # #).

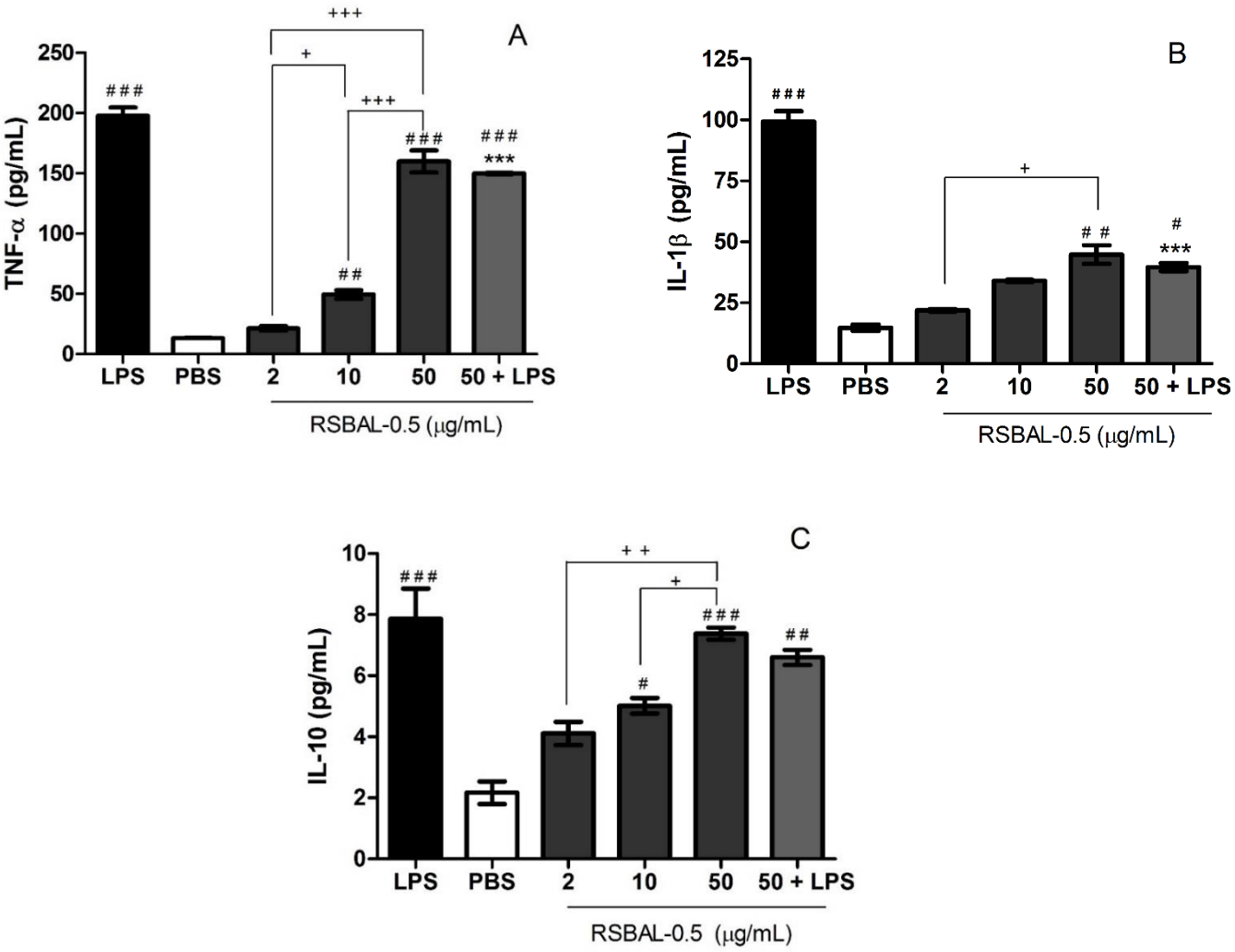


Fig 6. Ability of RSBAL-0.5 to stimulate the secretion of TNF-α (A), IL-1β (B) and IL-10 (C) by THP-1 macrophages. Cells were incubated with LPS (1 µg/mL), PBS, RSBAL-0.5 (2, 10 and 50 µg/mL), or RSBAL-0.5 + LPS (50 µg/mL + 1 µg/mL respectively). Statistical difference in comparison with LPS group (*), PBS group (#), and between the polysaccharide concentrations (+). $p < 0.05$ (#), $p < 0.01$ (# #) and $p < 0.001$ (# # #).

4. Conclusions

In this study we showed that the pectic polysaccharides RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5, obtained from infusion of *S. dendroideum* leaves, influence the secretion of both pro- and anti-inflammatory cytokines by macrophages. In the presence of a pro-inflammatory agent these polysaccharides exhibited an anti-inflammatory effect, preventing secretion of pro-inflammatory cytokines and maintaining secretion of an anti-inflammatory cytokine. Therefore, the anti-inflammatory effects of *S. dendroideum* could be, at least in part, due to its polysaccharides.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Grant number 449176/2014-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação Araucária for financial support; and UFPR-RMN Center for the NMR analyses.

5. References

[1] D. Silva-Torres, H. Montellano-Rosales, D. Ramos-Zamora, M.E. Castro-Mussot, C.M. Cerdagarcía-Rojas, Spermicidal activity of the crude ethanol extract of *Sedum praealtum* in mice, J Ethnopharmacol. 85 (2003) 15-17.

[2] C. Bensouici, A. Kabouche, A. Karioti, M. Ozturk, M.E. Duru, A.R. Bilia, Z. Kabouche, Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities, Pharm Biol. 54 (2016) 174-179.

[3] M.E. Camargo, M.B. Romero, D.R. Zamora, P.C. Carrillo, M.E.V. Maldonado, Study of the anti-inflammatory effect of *Sedum praealtum* (siempreviva) in the rat: dose dependent response, Proc West Pharmacol Soc. 45 (2002) 129-130.

[4] H. Lorenzi, H.M. Souza, Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras, terceira ed., Nova Odessa Plantarum, São Paulo, 2001, pp 476.

[5] G.O. De Melo, D.C. Malvar, F.A. Vanderlinde, F.F. Rocha, P.A. Pires, E.A. Costa, L.G. Matos, C.R. Kaiser, S.S. Costa, Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*, J Ethnopharmacol. 124 (2009) 228-232.

[6] V. Carrasco, L.A. Pinto, K.W. Cordeiro, C.A.L. Cardoso, K.C. Freitas, Antiulcer activities of the hydroethanolic extract of *Sedum dendroideum* Moc et Sessé ex DC. (balsam), J Ethnopharmacol. 158 (2014) 345–351.

[7] G.O. De Melo, D.C. Malvar, F.A. Vanderlinde, P.A. Pires, W.S. Côrtes, P.G. Filho, M.F. Muzitano, C.R. Kaiser, S.S. Costa, Phytochemical and pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice, J Ethnopharmacol. 102 (2005) 217-220.

[8] G. Santos, D.C. Oliveira, M.S.L. Santos, L.M. Neves, F.O. de Gaspi, F.A. Mendonça, M.A. Esquisatto, G.M. Santos, M.A. d'Avila, L.H. Mei, Innocentini Electrospun Membranes of Poly (Lactic Acid) (PLA) Used as Scaffold in Drug Delivery of Extract of *Sedum Dendroideum*, J. Nanosci. Nanotechnol. 13 (2013) 4694-4702.

[9] D.C. Malvar, P.A. Pires, G.O. Melo, S.S. Costa, P. Germando Filho, W.S. Côrtes, F.A. Vanderlinde, Influência do Pré-tratamento com o Sumo do *Sedum dendroideum* (Bálsamo) Sobre a Nocicepção de Camundongos (Mus musculus), Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida Seropédica. 24 (2004) 135-140.

[10] J. García-Pineda, M.A. Wens, A. Valencia, A.J. Gallegos, Acción de *Sedum dendroideum* sobre la actividad funcional de los espermatozoides, Arch Invest Med. 17 (1986) 391–397.

[11] D. Silva, M. L. Casanova, M.C. Marcondes, J. Espindola-Netto, L.P. Paixão, G.O. De Melo, P. Zancan, M. Sola-Penna, S.S. Costa, Antidiabetic activity of *Sedum dendroideum*: Metabolic enzymes as putative targets for the bioactive flavonoid kaempferitrin, Biochem Mol Biol Educ. 66 (2014) 361–370.

[12] A. Andrade-Cetto, M. Heinrich, Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes, J Ethnopharmacol. 99 (2005) 325–348.

[13] J.M. Wiest, H.H.C. Carvalho, C.A.M. Avancini, A.R. Gonçalves, Inibição e inativação in vitro de *Salmonella spp*. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61 (2009) 119-127.

[14] G.J. Niemann, J.M.J. Visser-Simons, H. Hart, Flavonoids of some species of Sedum, Planta Med. 30 (1976) 384-387.

[15] J. Zavala, P. Romero, D. Vazquez, B. Barba, J. Valdez, J.E. Valdez, Inhibition of pterygium fibroblasts proliferation by Siempre viva plant (*Sedum dendroideum*) extracts, Invest Ophthalmol Vis Sci. 56 (2015) 3034.

[16] A.M. Nascimento, L.M. Souza, C.H. Baggio, M.F.P. Werner, D. Maria-Ferreira, L.M. Silva, G.L. Sassaki, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, T.R. Cipriani, Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*, Phytochemistry. 85 (2013) 137–142.

[17] T.M. Cantu-Jungles, C.P. Almeida, M. Iacomini, T.R. Cipriani, M.C. Cordeiro, Arabinan-rich pectic polysaccharides from buriti (*Mauritia flexuosa*): An Amazonian edible palm fruit, Carbohydr Polym. 122 (2015) 276-281.

[18] Z.S. Wen, X.W. Xiang, H.X. Jin, X.Y. Guo, L.J. Liu, Y.N. Huang, X.K. OuYang, Y.L. Qu, Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages, Int. J. Biol. Macromolec. 88 (2016) 403-413.

[19] G.E. Nascimento, C.R. Corso, M.F.P. Werner, C.H. Baggio, M. Iacomini, L.M.C. Cordeiro, Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity, Carbohydr Polym. 116 (2015) 300-306.

[20] J. Carlotto, L.M. Souza, C.H. Baggio, M.F P. Werner, D. Maria-Ferreira, G.L. Sassaki, M. Iacomini, T.R. Cipriani, Polysaccharides from *Arctium lappa L.:* Chemical structure and biological activity, Int. J. Biol. Macromolec. 91 (2016) 954-960.

[21] C.L. Leivas, L.F. Nascimento, W.M. Barros, A.R.S. Santos, M. Iacomini, L.M.C. Cordeiro, Substituted galacturonan from starfruit: Chemical structure and antinociceptive and anti-inflammatory effects, Int. J. Biol. Macromolec. 84 (2016) 295-300.

[22] K.C. Senthil, M. Sivakumar, K. Ruckmani, Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Cyphomandra betacea* and its biological activities, Int. J. Biol. Macromolec. 92 (2016) 682–693.

[23] E.G. Maxwella, I.J. Colquhouna, H.K. Chaub, A.T. Hotchkissb, K.W. Waldrona, V.J. Morrisa, N.J. Belshaw, Rhamnogalacturonan I containing homogalacturonan inhibits colon cancer cell proliferation by decreasing I CAM1 expression, Carbohydr Polym. 132 (2015) 546–553.

[24] W. Chanput, J.J. Mes, H.J. Wichers, THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach, Int Immunopharmacol. 23 (2014) 37-45.

[25] J.B. Calixto, M.M. Campos, M.F. Otuki, A.R.S. Santos, Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules, Planta Med. 70 (2004) 93–103.

[26] R.L. Taylor, H.E. Conrad, Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups, Biochemistry. 11 (1972) 1383-1388.

[27] P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalia usnea*, Carbohydr Res. 128 (1984) 119-131.

[28] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal Chem. 28 (1956) 350-356.

[29] G.L. Sassaki, L.M. Souza, T.R. Cipriani, M. Iacomini, TLC of carbohydrates, in: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (Eds.), Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, CRC Press, Boca Raton, 2008, pp. 255-276.

[30] F.A. Pettolino, C. Walsh, G.B. Fincher, A. Bacic, Determining the polysaccharide composition of plant cell walls, Nat Protoc. 7 (2012) 1590-1607.

[31] T.M. Filisetti-Cozzi, N.C. Carpita, Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars, Anal Biochem. 197 (1991) 157-162.

[32] F. Ciucanu., A. Kerek, Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, Carbohydr Res. 131 (1984) 209-217.

[33] G.L. Sassaki, P.A. Gorin, L.M. Souza, P.A. Czelusniak, M. Iacomini, Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation, Carbohydr Res. 340 (2005) 731-739.

[34] A.T. Nguyen, T.T. Do, T.D. Nguyen, L.D. Pham, V.D. Nguyen, Isolation and characteristics of polysaccharide from *Amorphophallus corrugatus* in Vietnam. Carbohydr Polym. 84, (2011) p. 64-68.

[35] W. Chanput, J. Mes, R.A. Vreeburg, H.F. Savelkoul, H.J. Wichers, Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds, Food Funct. 1 (2010) 254-61.

[36] N.C. Carpita, D.M. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, Plant J. 3 (1993) 1-30.

[37] D. Mohnen, Pectin structure and biosynthesis, Curr Opin Plant Biol. 11 (2008) 266-277.

[38] K.T. Inngjerdingen, S.C. Debes, M. Inngjerdingen, S. Hokputsa, S.E. Harding, B. Rolstad, T.E. Michaelsen, D. Diallo, B.S. Paulsen, Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization, J. Ethnopharmacol. 101 (2005) 204-2014.

[39] G.O. Aspinall, H.K. Fanous, Structural Investigations on the Non-starchy Polysaccharides of Apples, Carbohydr Polym. 4 (1984) 93-214.

[40] S.V. Popov, R.G. Ovodova, V.V. Golovchenko, G.Y. Popova, F.V. Viatyasev, A.S. Shashkov, Y.S. Ovodov, Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium, Food Chem. 124 (2011) 309-315.

[41] P. Lerouge, M.A. O'Neill, A.G. Darvill, P. Albersheim, Structuralcharacterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I, Carbohydr Res. 243 (1993) 359–371.

[42] C.M.G. Renard, M. Lahaye, M. Mutter, F.G.J. Voragen, J.F. Thibault, Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp, Carbohydr Res. 305 (1997) 271-280.

[43] C.L. Delgobo, P.A.J. Gorin, C. Jones, M. Iacomini, Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrine*, Phytochemistry. 47 (1998) 1207-1214.

[44] J.C. Amorim, L.C. Vriesmann, C.L.O. Petkowicz, G.R. Martinez, G.R. Noleto, Modified pectin from *Theobroma cacao* induces potent pro-inflammatory activity in murine peritoneal macrophage, Int. J. Biol. Macromolec. 92 (2016) 1040–1048.

[45] J. Freysdottir, O.T. Logadottir, A. Omarsdottir, S.S. Vikingssona, I. Hardardottir, A polysaccharide fraction from *Achillea millefolium* increases cytokine secretion and reduces activation of Akt, ERK and NF-B in THP-1 monocytes, Carbohydr Polym. 143 (2016) 131–138.

[46] I.A. Schepetkin, M.T. Quinn, Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential, Int Immunopharmacol. 6 (2006) 317–333.

[47] H. Wagner, H. Stuppner, W. Schäfer, M. Zenk, Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures, Phytochemistry. 27 (1988) 119–126.

[48] S. Omarsdottira, J. Freysdottirb, E.S. Olafsdottir, Immunomodulating polysaccharides from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. subuliformis, Phytomedicine. 14 (2007) 179–184.

ARTIGO II

Gastroprotective activity of a pectic polysaccharide fraction obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves

Redigido nas normas da revista Phytomedicine

Gastroprotective activity of a pectic polysaccharide fraction obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves

Ana Flávia de Oliveira [a], Bruna Barbosa da Luz [b], Maria Fernanda de Paula Werner [b], Marcello Iacomini [a], Lucimara M.C. Cordeiro [a], Thales Ricardo Cipriani [a,*]

[a] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-980, CP 19046, Curitiba, PR, Brazil

[b] Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, CEP 81.531-980 Curitiba, PR, Brazil

* Corresponding author. Tel: +55 41 3361 1655;

E-mail address: trcipriani@ufpr.br (T. R. Cipriani).

Abstract

Sedum dendroideum, popularly known in Brazil as balsam, is traditionally used to treat gastric problems. In the present study was showed the gastroprotective effects of a pectic polysaccharide fraction obtained by infusion of *S. dendroieum* leaves. It acted preserving gastric mucus and glutathione levels in an ethanol-induced ulcer model in rats. HSQC analysis showed that the polysaccharide fraction contains a homogalacturonan and a homogalacturonan branched by side chains of arabinans and type II arabinogalactans. This study demonstrate, for the first time, that a polysaccharide fraction from *S. dendroideum* is effective in prevent gastric ulcer.

Keywords

Sedum dendroideum; Polysaccharide; Gastroprotective

1. Introduction

Sedum dendroideum, locally known as balsam, is a succulent plant popularly used in Brazil to treat earache, gastritis, bronchitis, anemia, as cicatrizing and to make syrups and ointments for wounds (Battisti et al., 2013; Haeffner et al., 2012).

Some pharmacological properties of *S. dendroideum* have been demonstrated. The juice of *S. dendroideum* leaves acted as an antinociceptive agent, inhibiting abdominal contortions induced by acetic acid in mice (Malvar et al., 2004), and as an anti-inflammatory agent, promoting both antinociceptive and antiedematogenic effects, after oral administration in mice submitted to the carrageenan-induced paw edema (De Melo et al., 2005). Considering its wound healing effects, Schmidt et al., (2009) described a moderate effect for the *n*-hexanic and ethanolic extracts of *S. dendroideum* on the fibroblasts migration and proliferation in the *in vitro* scratch assay. Also, previous studies demonstrate that hydroalcoholic extract of *S. dendroideum* leaves presents gastroprotective and antisecretory activity in rats models (Carrasco et al., 2014).

Gastric ulcer is a deep lesion in the gastric wall, which involves the whole thickness of the mucosa, reaching the muscle layer (Tarnawski et al., 1991). Studies showed that herbals presented therapeutic effects against gastric ulcer (Dos Reis Lívero et al., 2016; Potrich et al., 2010), and there is pharmacological response can be equivalent to commercial drugs available, besides the cost of herbal treatments is lesser than the traditional protocols established for the population.

Few studies validating the folk medicinal use of *S. dendroideum* have been done. When *S. dendroideum* is used medicinally in the form of tea (infusion or decoction) or as a juice made from its leaves, several active compounds including secondary metabolites and polysaccharides are ingested. The polysaccharides are widely known for their gastroprotective properties (Cipriani et al., 2006, Nascimento et al., 2013), however there

are no study describing this activity for polysaccharides of *S. dendroideum*. Therefore, considering de popular use of this plant to treat gastric problems and the properties of polysaccharides, we isolated a pectic polysaccharide fraction from the infusion of *S. dendroideum* leaves, that was chemically characterized and tested about its gastroprotective activity.

2. Experimental

2.1 Plant material

S. dendroideum was obtained in Campina Grande do Sul, State of Paraná (PR), Brazil, in December 2013. The plant was identified in the Municipal Botanical Museum of Curitiba, State of Paraná (PR), Brazil.

2.2 General analytical methods

All extracts were evaporated at <60 ºC under reduced pressure. Centrifugation was at 8,000 rpm, at 10 ºC, for 10 min. Carboxyl-reduction of polysaccharides (5 mg) was carried out using three successive cycles of the 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide method (Taylor et al., 1972), to give a carboxy-reduced polysaccharide fraction. $NaBH_4$ being used as reducing agent.

2.3 Extraction and fractionation of polysaccharides from leaves of S. dendroindeum

Freeze dried leaves of *S. dendroindeum* (1.25 kg) were ground and submitted to extraction with H_2O (100 g/L) by infusion. The aqueous extracts were combined, filtered, concentrated to a small volume (300 mL), and added to cold EtOH (3 volumes). The resulting precipitate was separated by centrifugation, dissolved in H_2O, dialyzed at a 6-8 kDa cut-off membrane in running water, for 2 days and freeze-dried, to give the crude

polysaccharide fraction (11.3 g). This fraction was dissolved in H_2O (200 mL) at room temperature, and submitted to freeze-thawing (Gorin et al., 1984), until no more precipitate appear. The soluble portion (SBAL) was recovered by centrifugation and dialyzed at a 100 kDa cut-off membrane to give a retained (RSBAL) and an eluted (ESBAL) fraction, which were freeze-dried (Fig. 1).

2.4 HPSEC analysis

Homogeneity and average molar mass (M_w) values of the polysaccharides were determined by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). The analyses of the samples were performed on a Waters chromatograph equipped with four Ultrahydrogel columns connected in series (2000, 500, 250, 120; with exclusion sizes of 7×10^6, 4×10^5, 8×10^4, and 5×10^3 Da respectively) and attached to a multidetection system, which consisted of a Waters 2410 differential refractometer (RI). The eluent was 0.1 M aq. $NaNO_2$ containing 0.5 g/L NaN_3, with flow of 0.6 mL/min. The samples, at a concentration of 1 mg/mL, previously filtered through a membrane (0.22 µm), were injected (100 µL loop), and analyzed at 25 ºC. The molar mass specific refractive index increment (*dn*/*dc*) was determined using the same equipment with the columns uncoupled. Samples at concentrations of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mg/mL, previously filtered through a membrane (0.22 µm), were injected (500 µL loop) and analyzed at 25 °C using only the RI detector. The eluent was the same described above. Results were analised using the Wyatt Technology ASTRA software, version 4.70.07.

2.5 Monosaccharide analysis

The polysaccharides (2 mg) were hydrolyzed with 1 M TFA (1 mL) at 100 ºC for 16 hours, the solution was then evaporated, and the residue dissolved in H_2O (500 µL).

The resulting monosaccharide mixture was examined by silica-gel 60 thin layer chromatography (TLC; Merck), the plates being developed with AcOEt:OHAc:*n*-PrOH:H_2O (4:2:2:1 v/v) and stained with orcinol-H_2SO_4 at 100 °C (Sassaki et al., 2008). The hydrolyzate was also treated with $NaBH_4$ (2 mg), and after 18 h, HOAc (0.5 mL) was added for neutralization, the solution evaporated to dryness and the resulting boric acid removed as trimethyl borate by co-evaporation with MeOH. Acetylation was carried out with Ac_2O-pyridine (1:1 v/v, 0.5 mL) at room temperature for 18 h, and the resulting alditol acetates were extracted with $CHCl_3$. These were analyzed by GC-MS (Varian Saturn 2000R - 3800 gas chromatograph coupled to a Varian Ion-Trap 2000R mass spectrometer), using a VFS MET column (30 m x 0.25 mm i.d.) programmed from 100 to 280 ºC at 10 ºC/min, with He as carrier gas. Components were identified by their typical retention times and electron impact spectra, compared to alditol acetates prepared from standard monosaccharides (Sigma-Aldrich). The results were given as mol%, calculated according to Pettolino et al., (2012). Uronic acid contents of polysaccharides were determined using the colorimetric *m*-hydroxybiphenyl method (Filisetti-Cozzi et al., 1991).

2.6 NMR analysis

$^{1}H/^{13}C$ HSQC-DEPT analyses were performed in a 400 MHz Bruker model Avance III spectrometer with a 5 mm inverse probe, at 70 °C in D_2O. Chemical shifts (δ) were expressed in ppm relative to acetone, at (C^{13}/H^{1}) δ 30.2/2.22. The degree of methyl-esterification was determined by integration of the cross peak of C-5/H-5 of 6-*O*Me-α-D-Gal*p*A and α-D-Gal*p*A units on HSQC experiment.

2.7 Animals

Female Wistar rats weighing between 180-200 g, obtained from the Biotery of Federal University of Paraná were kept under standard laboratory conditions. Animals were housed in collective plastic cages (maximum of 5 rats per cage) with pine shavings bedding and free access to water and food (Nuvi-Lab CR-1, Quimtia S/A, Brazil), under a 12 h light/dark cycle and at controlled temperature (22 ± 2 ºC). All experiments were conducted in agreement with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (8th edition, National Research Council, 2011) and approved by the Committee of Animal Experimentation of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO − UFPR; approval number 1010).

2.8 Induction of gastric lesion by ethanol

The experimental procedure to induce gastric lesions by oral administration (p.o.) of ethanol was performed according Robert et al., (1979). The rats fasted (16 h) with free access the water, were pretreated with a single oral dose of water (vehicle (V): 1 mL/kg), omeprazole (O: 40 mg/kg) or the polysaccharide fraction isolated from *Sedum dendroideum* (RSBAL: 0.35, 0.70 and 1.4 mg/kg). After 1 h of treatments, all animals (N=10) received ethanol P.A. (1 mL/rat) and then, animals were euthanized 1 h later by thiopental overdose (100 mg/kg, i.p.) followed by cervical dislocation. To analyze the gastric lesions, the stomachs were immediately excised, opened along the greater curvature, cleaned with cold saline, stretched flat and then photographed for provides visual evidence of hemorrhagic ulcers. All ulcer wound were drawing and measure by computerized planimetry using the program Image Tool® 3.0, and the lesion area was expressed in mm^2.

2.9 Determination of gastric wall mucus

The gastric mucus barrier is a protective factor of the mucosa and was determined through the model proposed by Corne et al., (1974). A half sample of the glandular portion of the stomach were complexed with a dye solution 0.1% Alcian Blue during 2 h. Then, the tissue was washed with 250 mM sucrose twice for 15 and 45 min respectively, and then complex mucus-dye was extracted adding 500 mM magnesium chloride and stirred intermittently for 2 h. The solution extracted was mixed with the same ether volume and centrifuged for 10 min at 3600 rpm. The aqueous layer was separated and absorbance was measured at 580 nm. The concentration of Alcian blue was calculated and the results were expressed in mg Alcian blue/g of glandular tissue.

2.10 Analysis of biochemical parameter of gastric tissue

For determine glutathione (GSH) levels on the gastric tissue, samples were homogenized with ice cold 200 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) in a volume equal to three times of the fresh weight of gastric tissue. According to the method described by Sedlak and Lindsay (1968) with some modifications, aliquots of the samples were mixed with 12.5 % trichloroacetic acid (ATC) and vigorously shaking before being centrifuged at 3000 rpm for 15 min at 4 ºC. In a 96-well plate was pipette the supernatant of the samples and added for colorimetric reaction 400 mM TRIS-HCl buffer (pH 8.5) and 10 mM 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Then, the absorbance of reaction was read at 412 nm. The values obtained were interpolated with a standard curve of GSH and results were expressed as μg GSH/g of tissue.

2.11 Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Statistical differences between experimental groups (n= 5-10 animals per group) were analyzed with

one-way ANOVA followed by Bonferroni's multi-comparison post-hoc test, using the GraphPad Prism® version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Differences were considered to be significant when $P \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Fractionation and structural analysis of polysaccharides

Freeze dried leaves of *S. dendroideum* were submitted to infusion, and the extract obtained was added to 3 volumes of cold EtOH to give a crude precipitate of polysaccharides. This was subjected to the freeze-thawing process to give a soluble polysaccharide fraction (SBAL; 4.1 g), which presented two peaks in the HPSEC-RI analysis (Fig. 2). It was then fractionated by dialysis at a 100 kDa cut-off membrane, resulting in a retained (RSBAL; 62%) and an eluted fraction (ESBAL; 38%), which showed HPSEC-RI elution profiles containing a single peak (Fig. 2).

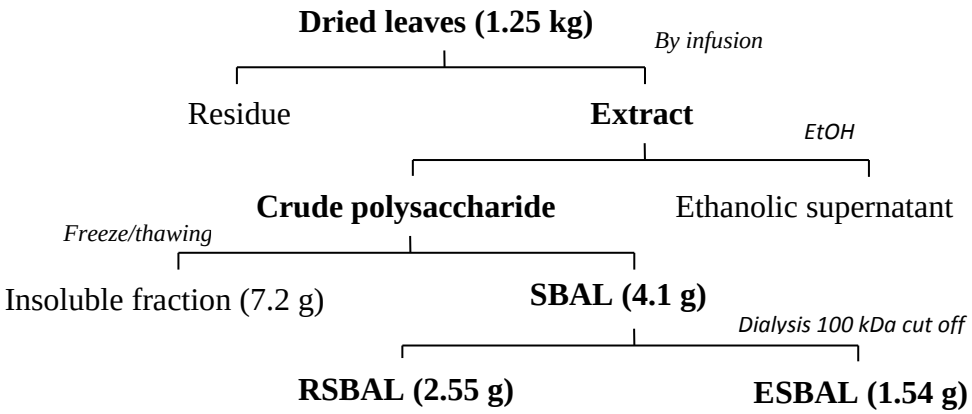


Figure. 1. Flowchart of the extraction and purification process of polysaccharides of *Sedum dendroideum* leaves.

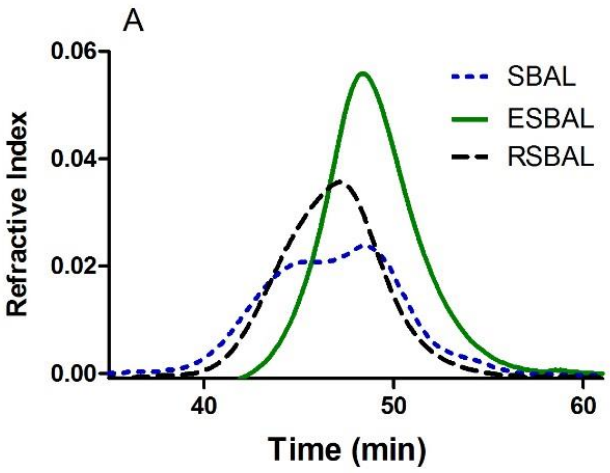


Figure 2. Elution profiles of SBAL, RSBAL and ESBAL on HPSEC, using RI detection.

The main fraction (RSBAL) had a M_w of 116,000 g/mol (*dn*/*dc* = 0.146), and contained galacturonic acid, rhamnose, arabinose, galactose and glucose in a 31:3:2:3:1 molar ratio. TLC analysis of the monosaccharide mixture obtained by acid hydrolysis of RSBAL indicated presence of galacturonic acid. Galacturonic acid residues are usually present homogalacturonans and rhamnogalacturonans, with the latter frequently being substituted by side chains of neutral polysaccharides. (Mohnen et al., 2008)

HSQC-DEPT of RSBAL (Fig. 3) showed $^{1}H/^{13}C$ correlations at δ 99.8/4.96 (C-1/H-1), 78.4/4.44 (C-4/H-4), 70.5/5.06 (C-5/H-5) and 52.8/3.81 (–CO_2-$\underline{CH_3}$) typical of α-1,4-linked 6-*O*Me-D-Gal*p*A units (Nascimento et al., 2013), and at δ 99.0/5.13 (C-1/H-1), 78.4/4.44 (C-4/H-4) and 71.4/4.67 (C-5/H-5) of non-methyl-esterified α-1,4-linked D-Gal*p*A units (Renard et al., 1998). Moreover, typical signals of acetyl group were observed at δ 20.1/2.10 (Nascimento et al., 2013). Acetyl groups can be present in homogalacturonans and rhamnogalacturonans, frequently substituting Gal*p*A units at O-2 or O-3 (Mohnen et al., 2008). HSQC-DEPT of RSBAL also showed $^{1}H/^{13}C$ correlations of 3,6-linked β-D-Gal*p* units at δ 103.0/4.50 (C-1/H-1), 80.1/3.78 (C-3/H-3) and 69.4/4.06 (C-6/H-6) (Delgobo et al., 1998; Nascimento et al., 2013), and $^{1}H/^{13}C$ correlations of C-

1/H-1 of α-L-Ara*f* units at δ 108.3/5.42 and 109.1/5.25 (Delgobo et al., 1998), and of C-6/H-6 of α-L-Rha*p* units observed at 16.6/1.26 (Renard *et al*., 1998).

In a previous work (Oliveira et al., 2017) the polysaccharide RSBAL was fractionated by anion exchange chromatography, resulting in two polysaccharides – a high methyl-esterified homogalacturonan (RSBAL-H_2O) and a high methyl-esterified homogalacturonan branched by side chains of arabinans and type II arabinogalactans (RSBAL-0.5). The correlations obtained in the HSQC-DEPT of RSBAL are in agreement with those obtained previously for RSBAL-H_2O and RSBAL-0.5.

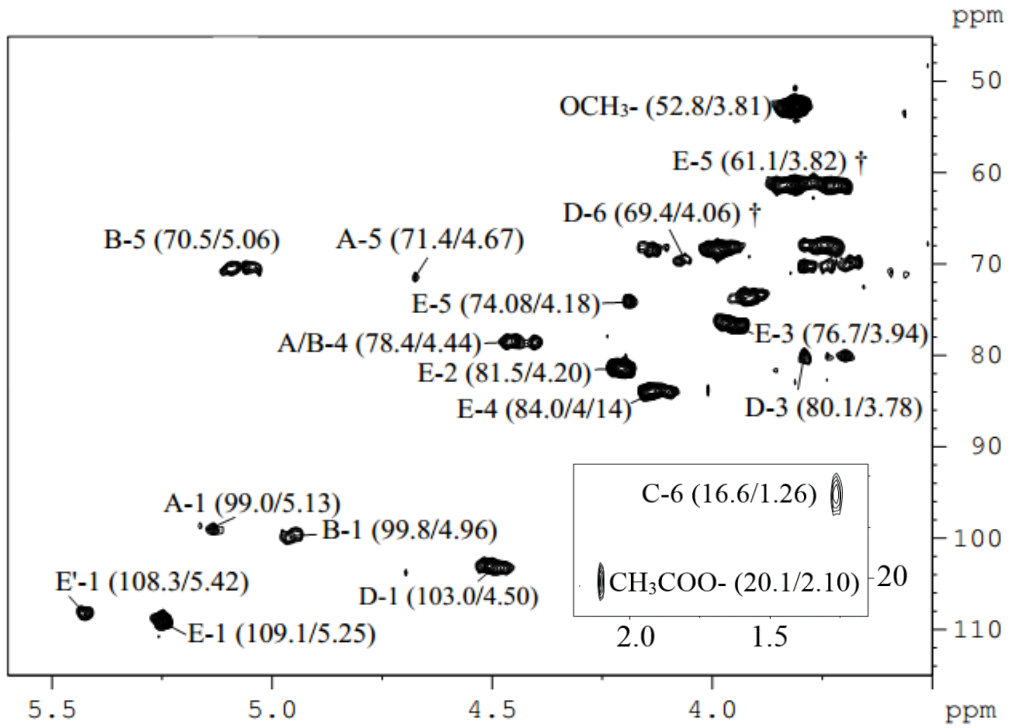


Figure 3. $^{1}H/^{13}C$ HSQC-DEPT of RSBAL. Solvent D_2O, at 70 ºC; numerical values are in δ ppm. A (α-D-Gal*p*A), B (6-OMe-α-D-Gal*p*A), C (α-L-Rha*p*), D (β-D-Gal*p*), E and E' (α-*L*-Ara*f*). The letters are followed by the carbon number of the monosaccharide unit. † Inverted signals representing.

3.2 Gastroprotective activity of RSBAL

The ethanol-induced ulcer model is very used to study acute gastric lesions, which resembles a hemorrhagic gastritis in humans (Robert et al., 1979). It is well recognized that the main drugs used for treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease are the suppressors of gastric acid secretion, namely H2 receptor antagonists and proton pump inhibitors, such as ranitidine and omeprazole respectively (Malfertheiner et al., 2009). The polysaccharide fraction RSBAL, isolated from infusion of *S. dendroideum* leaves, when administered by oral route at doses of 0.35, 0.70 and 1.4 mg/kg significantly reduced gastric ulceration induced by ethanol in rats when compared with the vehicle in 45.81, 41.99 and 64.95 % respectively (V: 137.7 ± 25.77 mm^2) (Fig. 4). In our study, omeprazole (40 mg/kg) was used as positive control and reduced ethanol-induced gastric ulceration in 93.3% when compared with the vehicle group (Fig. 4).

However, the prolonged use of proton pump inhibitors modify the colonic microflora, increasing the predisposition to *Clostridium difficile* infections (Kostrzewska et al., 2017). Other harmful effect of gastric acid suppression is associated with low absorption of iron and calcium that in turns causes nutritional deficiencies such as anemia and contributes to the onset of osteoporosis, respectively (Lam et al., 2016).

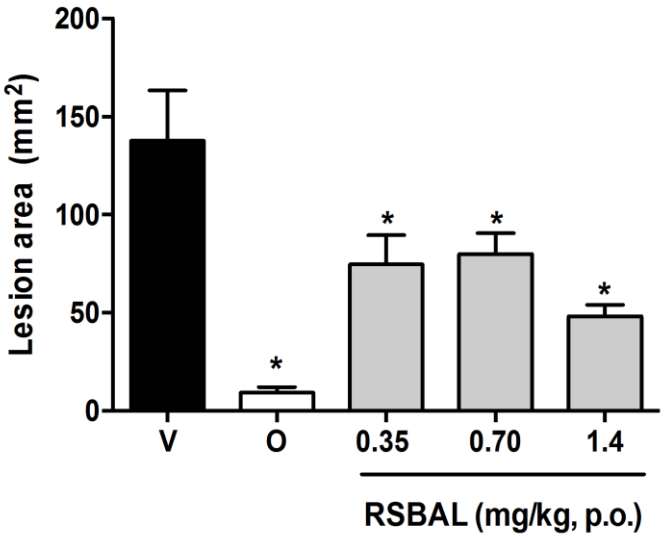


Figure 4. Effect of oral pretreatment with polysaccharide fraction RSBAL of leaves from *Sedum dendroideum* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. The animals (n= 10) were orally treated with vehicle (V: water 1mL/kg), Omeprazole (O: 40 mg/kg) or RSBAL (0.35, 0.70 and 1.4 mg/kg), 1 h before oral ethanol P.A. (1 mL/animal) administration. The results are expressed as mean ± S.E.M. *P <0.05 when compared to vehicle group (V).

As previously mentioned, ethanol causes hemorrhagic lesions on gastric mucosa (Masuda et al., 1995), which results in significantly decrease of the gastroprotective factors, such as depletion of wall mucus and GSH, the most abundant and important endogenous antioxidant (Bhattacharyya et al., 2014). Here, the ethanol administration depleted ~ 60.1% of gastric mucus when compared with the naive group (not injured animals), while the positive control (omeprazole) prevented depletion in 83.59 % in relation to naive. (N: 2981 ± 191.8 µg Alcian Blue/g of tissue). However, the pretreatment of animals with RSBAL at 0.35, 0.70 and 1.4 mg/kg significantly prevented in 45.38, 41.14 and 41.03 % the gastric mucus depletion when compared to the vehicle control group (V: 1190 ± 95.58 µg Alcian blue/g of tissue) (Fig. 5A). In relation to the antioxidant system, the vehicle control group decreased GSH levels in 81.1% after the ethanol administration, when compared with the naive group (N: 2877 ± 663.0 µg GSH/g of

tissue). In sharp contrast, the administration of RSBAL in all tested doses (0.35, 0.70 and 1.4 mg/kg) promotes the preservation of GSH levels in 72.84, 72.43 and 70.53 % in the gastric tissue when compared to the vehicle control group (V: 544.5 ± 36.08 µg GSH/g of tissue), very similarly to the GSH preservation promoted by omeprazole (71.38 %) (Fig. 5B).

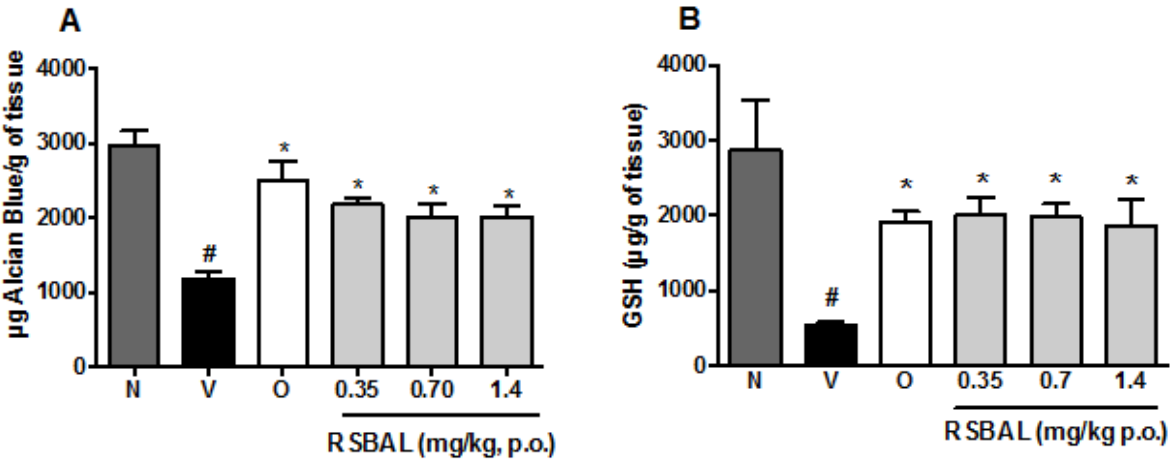


Figure 5. Effect of oral pretreatment with polysaccharide fraction RSBAL of leaves from *Sedum dendroideum* on wall mucus (A) and on glutathione (GSH) level (B) in gastric ulcers induced by ethanol in rats. The animals were orally treated with vehicle (V: water 1mL/kg), Omeprazole (O: 40 mg/kg), RSBAL (0.35, 0.70 and 1.4 mg/kg) and group Naive (N), 1 h before oral ethanol P.A. (1 mL/animal) administration. The results are expressed as mean ± S.E.M (n=5). *P <0.05 when compared to vehicle group (V). # P <0.05 when compared to Naive group.

In a previous study, a rhamnogalacturonan isolated from *Tamarindus indica* L. showed antioxidant activity *in vitro* (Sharma et al., 2015). Furthermore, Maria-Ferreira et al., (2014) demonstrated that a rhamnogalacturonan isolated from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen presented gastroprotective effect, through gastric mucus preservation and the

GSH levels conservation, which resembles the present data obtained with RSBAL, confirming and reinforcing the gastroprotective property of pectic polysaccharides.

4. Conclusion

The results showed that the infusion of *S. dendroideum* contain a pectic polysaccharide fraction (RSBAL), constituted by homogalacturonans and neutral structures of arabinan and type II arabinogalactan, which present gastroprotective activity, significantly prevented mucus gastric and GSH depletion. Thus, the gastroprotection related to the *S. dendroideum* could be attributed to polysaccharides.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Grant number 449176/2014-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação Araucária for financial support; and UFPR-RMN Center for the NMR analyses.

5. References

Battisti, C., Garlet, B.T.M., Essi, L., Horbach, R. K., Andrade, A., Badke, R.M., 2013. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. Rev Bras Biocienc. 11, 338-348.

Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S.E., 2014. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. Physiol Rev**.** 94, 329-354.

Carrasco, V., Pinto, L.A., Cordeiro, K.W., Cardoso, C.A.L., Freitas, K.C., 2014. Antiulcer activities of the hydroethanolic extract of *Sedum dendroideum* Moc et Sessé ex DC. (balsam). J. Ethnopharmacol. 158, 345–351.

Cipriani, T.R., Mellinger, C.G., Souza, L.M., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marques, M.C., Gorin, P.A., Sassaki, G.L., Iacomini, M., 2006. A Polysaccharide from a Tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* Leaves with Anti-ulcer Protective Effects, Journal of Natural Products. 69, 1018–1021.

Corne, S. J., Morrissey, S. M., Woods, R. J., 1974. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. J Physiol. 242, 116-117.

De Melo, G.O., Malvar, D.C., Vanderlinde, F.A., Pires, P.A., Côrtes, W.S., Filho, P.G., Muzitanoa, M.F., Kaiserd, C.R., Costa, S.S., 2005. Phytochemical and pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice. J Ethnopharmacol. 102, 217-220.

Delgobo, C.L., Gorin, P.A.J., Jones, C., Iacomini, M., 1998. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. Phytochemistry. 47, 1207-1214.

Dos Reis Lívero, F.A.R., Silva, L.M., Maria-Ferreira, D., Galuppo, L.F., Borato, D.G., Prando, T.B.L., Lourenço, B.E.L., Strapasson, B.R.L., Stefanello, M.E.A., Maria Fernanda de Paula Werner, M.F.P., Acco, A. 2016. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. Naunyn Schmiedeberg's Arch of Pharmacol. 389, 985–998.

Filisetti-Cozzi, T.M. & Carpita, N.C., 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Anal Biochem. 197, 157-162.

Gorin, P. A. J. & Iacomini, M., 1984. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalia usnea*. Carbohydr Res, 128, 119-131.

Haeffner, R., Heck, R.M., Ceolin, T., Jardim, V.M.R., Barbieri, R.L., 2012. Plantas medicinais utilizadas para o alívio da dor pelos agricultores ecológicos do Sul do Brasil. Rev Eletr Enf. 14, 596-602.

Kostrzewska M. Świdnicka-Siergiejko A., Olszańska D., Jurkowska G., Garley M., Ratajczak-Wrona W., Jabłońska E., Jamiołkowski J., Dabrowski A., 2017. The effect of omeprazole treatment on the gut microflora and neutrophil function. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 1-10.

Lam, J. R., Schneider, J. L., Quesenberry, C. P., Corley, D. A., 2016. Proton pump inhibitor and histamine-2 receptor antagonist use and iron deficiency. Gastroenterology. 152, 821–829.

Malfertheiner P., Chan F., Mccoll K., 2009. Peptic ulcer disease. The Lancet**.** 374, 1449-1461.

Malvar, D.C., Pires, P.A., Melo, G.O., Costa, S.S., Germano Filho, P., Côrtes, W.S.E Vanderlinde, F.A., 2004. Influência do Pré-tratamento com o Sumo do *Sedum dendroideum* (Bálsamo) Sobre a Nocicepção de Camundongos (Mus musculus). Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. 24, 135-140.

Maria-Ferreira D., Silva L.M., Mendes D.A., Cabrini D.A., Nascimento A.M., Iacomini M., Cipriani T.R., Santos A.R., Werner M.F., Baggio C.H., 2014. Rhamnogalacturonan

from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: Gastroprotective and Ulcer Healing Properties in Rats. Plos One. 9.

Masuda E., Kawano S., Nagano K., Tsuji S., Takei Y., Tsujii M., Oshita M., Michida T., Kobayashi I., Nakama A. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. Gastroenterology. 108: 58-64. 1995.

Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. Curr Opin Plant Biol. 11, 266-277.

Nascimento, A.M., Souza, L.M., Baggio, C.H., Werner, M.F.P., Maria-Ferreira, D., Silva, LM., Sassaki, GL., Gorin, PA.J., Iacomini, M., Cipriani, T.R., 2013 Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. Phytochemistry. 85, 137–142.

Oliveira, A.F., Nascimento, G.E., Iacomini, M,. Cordeiro, L.M.C., Cipriani, T.R., 2017. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharides obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves. Int. J. Biol. Macromol.

Pettolino, F.A., Walsh, C., Fincher, G.B., Bacic, A., 2012. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. Nat Protoc. 7, 1590-1607.

Potrich, F. B., Allemand, A., da Silva, L. M., dos Santos, A. C., Baggio, C. H., Freitas, C.S., Mendes, D.A., Andre, E., Werner, M.F., Marques, M.C. 2010. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. J ethnopharmacol. 130, 85-92.

Renard, C.M.G., Lahaye, M., Mutter, M., Voragen, F.G.J., Thibault, J.F., 1998. Isolation and structural characterization of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. Carbohydr Res. 305, 271-280.

Robert A, Nezamis J.E, Lancaster C, Hanchar A.J., 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. Gastroenterology. 77, 433–443.

Sassaki, G.L., Souza, L.M., Cipriani, T.R., Iacomini, M., 2008. TLC of carbohydrates, in: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (Eds.), Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, CRC Press, Boca Raton, USA. 255-276.

Schmidta, C., Fronzaa, M., Goettertb, M., Gellerb, F., Luikb, S., Flores, E.M.M., Bittencourtd, C.F., Zanettie, G.D., Heinzmanne, B.M., Lauferb, S., Merfort, I., 2009. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. J Ethnopharmacol. 122, 523–532.

Sedlak, J., Lindsay, R. H., 1968. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydnil groups in tissues with Ellman`s reagent. Anal Biochem. 25, 192-205.

Sharma R., Kamboj S., Khurana R., Singh G., Rana, V., 2015. Physicochemical and functional performance of pectin extracted by QbD approach from *Tamarindus indica* L. pulp. Carbohydr Polym. 134, 364-374.

Tarnawski, A., Stachura, J., Krause, W.J., Douglass, T., Gergely, H., 1991. Quality of gastric ulcer healing: a new emerging concept. J Clin Gastroenterol. 13, 42-47.

Taylor, R.L., Conrad, H.E. 1972. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups, Biochemistry. 11, 1383-1388.

ARTIGO III

Polysaccharides with anti-ulcer protective effects isolated from infusion of *Casearia sylvestris* leaves.

Redigido nas normas da revista International Journal of Biological Macromolecules

Bioguided fractionation for gastroprotective activity of polysaccharides isolated from infusion of *Casearia sylvestris* leaves.

Ana Flávia de Oliveira [a], Mariana Mayer Mion [b], Bruna Barbosa da Luz[b], Maria Fernanda de Paula Werner [b], Marcello Iacomini [a], Lucimara M.C. Cordeiro [a], Thales Ricardo Cipriani [a,*]

[a] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-980, CP 19046, Curitiba, PR, Brazil

[b] Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, CEP 81.531-980 Curitiba, PR, Brazil

* Corresponding author. Tel: +55 41 3361 1655;

E-mail address: trcipriani@ufpr.br (T. R. Cipriani).

Abstract

Casearia sylvestris, popularly known in Brazil as "guaçatonga", is used in folk medicine for treatment of inflammatory and gastrointestinal diseases. A polysaccharide fraction (E50) was isolated from infusion of *C. sylvestris* leaves. Methylation and NMR analysis showed E50 polysaccharide fraction is constituted of type II arabinogalactan. The crude polysaccharide fraction (CP) and E50 were able to promote acute protection against ethanol-induced gastric ulcer, with E50 also inhibiting development of acetic acid-induced chronic ulcer in rats. The pharmacological effects of CP and E50 show that at least part of the gastrointestinal effects of *C. sylvestris* are due to polysaccharides.

Keywords: *Casearia sylvestris*; Polysaccharide; Arabionogalactan; Gastroprotective.

1. Introdution

Leaves of *Casearia sylvestris*, popularly known as "guaçatonga", are widely used in folk medicine for treatment of inflammatory and gastrointestinal diseases, as antiseptic, anesthetic and antitumor [1-3]. Different pharmacological studies have demonstrated the importance of *C. sylvestris* extracts and its compounds, corroborating with reports about traditional use of the plant.

C. sylvestris leaves contain compounds with anti-inflammatory properties [4], observed in venom-evoked inflammatory models [5], paw edema and pleurisy induced by carrageenan [6], and antinociceptive effects in conditions associated with inflammatory pain [7]. Healing action and efficacy in the treatment of second-degree burns have been described for extracts of *C. sylvestris* [4, 8-10]. It was also effective against some tumor cell lines [11-17], and had antioxidant action [18, 19]. In addition, Basile et al. [1] and Sertié et al. [2] demonstrated the antiulcer activity of crude extract and ethanolic extract respectively of *C. sylvestris* leaves and Esteves et al. [20] showed gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *C. sylvestris* leaves.

The studies found in the literature suggest that the antiulcer activity of *C. sylvestris* is attributed to the presence of volatile oils, tannins, triterpene, terpenes and other secondary metabolites in leaves extracts [1, 2, 24]. However, plant polysaccharides are obtained in tea preparations (infusion, decoction) and are widely known for their gastroprotective properties [25-28]. Therefore, the objective of the present study was to investigate the antiulcer activity of a polysaccharide obtained from the infusion of *C. sylvestris* leaves, using models of acute and chronic gastric ulcer.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Leaves of *Casearia sylvestris* were collected in the city of Curitiba/PR, in the region of the Brazilian Atlantic Forest. The plant was identified in the herbarium of the Botany Department, of the Federal University of Paraná. The plant is deposited in the Herbarium of the Botany Department of Federal University of Paraná, as voucher no. 86694.

2.2. General analytical methods

The leaves were dried in an oven with circulation of air at 45 ºC for 2 days. All extracts were evaporated at <60 ºC under reduced pressure. Centrifugation was at 8,000 rpm, at 10 ºC, for 10 min.

2.3. Extraction and purification of the polysaccharides from *C. sylvestris* leaves

Dried leaves of *C. sylvestris* (567 g) were submitted to extraction with water (100 g/L) by infusion. After adding boiling water, the material was lightly stirred and allowed to rest until cooling. The aqueous extract was filtered, concentrated to 100 mL, and added to cold EtOH (300 mL). The resulting precipitate was separated, dissolved in distilled water, dialyzed at a 6-8 kDa cut-off membrane in running water, and freeze-dried, to give the crude polysaccharide fraction. This fraction was dissolved in H_2O (200 mL), and submitted to the freeze-thawing process [29], resulting in insoluble (PCS) and soluble (SCS) fractions. SCS was dialyzed at 100 kDa cut-off membrane, to give retained (R100) and eluted (E100) fractions. E100 was then submitted to a new dialysis at a 50 kDa cut-off membrane, to give retained (R50) and eluded (E50) fractions.

2.4. HPSEC analysis

Homogeneity and average molar mass (M_w) values of the polysaccharides were determined by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). The analyses of the samples were performed on a Waters chromatograph equipped with four Ultrahydrogel columns connected in series (2000, 500, 250, 120; with exclusion sizes of 7 x 10^6, 4 x 10^5, 8 x 10^4, and 5 x 10^3 Da respectively) and attached to a Waters 2410 differential refractometer (RI). The eluent was 0.1 M aq. $NaNO_2$ containing 0.5 g/L NaN_3, with flow of 0.6 mL/min. The samples, at a concentration of 1 mg/mL, previously filtered through a membrane (0.22 µm), were injected (100 µL loop), and analyzed at 25 ºC. The molar mass specific refractive index increment (*dn*/*dc*) was determined using the same equipment with the columns uncoupled. Samples at concentrations of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mg/mL, previously filtered through a membrane (0.22 µm), were injected (500 µL loop) and analyzed at 25 °C using only the RI detector. The eluent was the same described above. Results were analised using the Wyatt Technology ASTRA software, version 4.70.07.

2.5. Monosaccharide analysis

The polysaccharides (2 mg) were hydrolyzed with 1 M TFA (1 mL) at 100 ºC for 18 hours, the solution was then evaporated, and the residue dissolved in H_2O (500 µL). The resulting monosaccharide mixture was examined by silica-gel 60 thin layer chromatography (TLC; Merck), the plates being developed with ethyl acetate:acetic acid:1-propanol:water (4:2:2:1 v/v) and stained with orcinol-H_2SO_4 at 100 °C [30]. The hydrolyzate was also treated with $NaBH_4$ (2 mg), and after 18 h, HOAc (0.5 mL) was added for neutralization, the solution evaporated to dryness and the resulting boric acid removed as trimethyl borate by co-evaporation with MeOH. Acetylation was carried out

with Ac_2O-pyridine (1:1 v/v, 0.5 mL) at room temperature for 18 h, and the resulting alditol acetates were extracted with $CHCl_3$. These were analyzed by GC-MS (Varian Saturn 2000R - 3800 gas chromatograph coupled to a Varian Ion-Trap 2000R mass spectrometer), using a VFS MET column (30 m x 0.25 mm i.d.) programmed from 100 to 280 ºC at 10 ºC/min, with He as carrier gas. Components were identified by their typical retention times and electron impact spectra, compared to alditol acetates prepared from standard monosaccharides (Sigma-Aldrich). The results were given as mol%, calculated according to Pettolino et al. [31].

2.6. Methylation analysis

The polysaccharides (10 mg) were per-*O*-methylated according to the method of Ciucanu and Kerek [32], using powdered NaOH in DMSO-MeI. The product was hydrolyzed with 0.5 mL of 72% H_2SO_4 (w/v) for 1 h at 0 ºC, followed by addition of H_2O (4.0 mL) and heating at 100 ºC for 16 h [33]. The hydrolyzates were neutralized with $BaCO_3$, filtered, then reduced with $NaBD_4$ (2 mg) and acetylated as described above to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates. These were analyzed by GC-MS using the same conditions as described for alditol acetates. They were identified by their typical retention times and electron impact spectra, compared to partially *O*-methylated alditol acetates according to [34]. The results were given as mol%, calculated according to Pettolino et al. [31].

2.7. NMR analysis

$^{13}C/^{1}H$ HSQC-DEPT analyses were performed in a 400 MHz Bruker model Avance III spectrometer with a 5 mm inverse probe, at 70 °C in D_2O. Chemical shifts (δ) were expressed in ppm relative to acetone, at (C^{13}/H^{1}) δ 30.2/2.22.

2.8. Animals

All experiments were conducted using female Wistar rats weighing between 180-200 g, housed 5 per cage with soft pine wood shaving bedding with free access to food (Nuvi-Lab CR-1, Quimtia S/A, Brazil) and water, kept in 12 h light/dark cycle in a controlled temperature environment (22 ± 2 ºC). Animals were obtained from the Biotery of Federal University of Paraná, and all protocols and procedures and were conducted in agreement with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (8th edition, National Research Council, 2011) and approved by the Committee of Animal Experimentation of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO − UFPR; approval number 821).

2.9. Acute gastric ulcer induced by ethanol

Acute gastric lesions were induced in overnight (18 h) fasted rats (N=6-8) with free access to drinking water by oral administration (p.o.) of absolute EtOH (1 mL/animal) as previously described by Robert et al [35], with minor modifications. Animals were pretreated orally with water (Control (C): 1 mL/kg), omeprazole (40 mg/kg) and with crude polysaccharide of *C. sylvestris* (CP: 0.003, 0.03 and 0.3 mg/kg). In the following experiments, polysaccharide fractions ISC (0.2 mg/kg), R100 (0.005 mg/kg), E50 (0.03 mg/kg) and R50 (0.006 mg/kg), which doses were calculated according to their respective yield were also administrated by oral route. When ISC and E50 were administrated by intraperitoneal route (i.p.), we employed the doses of 0.02 and 0.003 mg/kg, respectively. After 1 h for p.o. or 30 min for i.p. treatments, all groups received ethanol P.A. (1 mL/rat) and then, animals were euthanized 1 h later by thiopental overdose (100 mg/kg, i.p.) followed by cervical dislocation. The stomachs were removed and

opened through the small curvature and the area of the gastric lesion (mm^2) was evaluated using the software ImageTool 2.0®, as previously described by Nascimento et al, [36].

2.10. Chronic gastric ulcer induced by acetic acid

The model of chronic acetic acid-induced gastric ulcers in rats was performed according to Okabe et al. with modifications [37], to evaluate the gastric ulcer healing. Animals were anesthetized with a combination of xylazine and ketamine (10 and 5 mg/kg, i.p. respectively) and after a laparotomy, the stomach was exposed and a cylinder (6 mm of diameter) containing 500 µL of a solution of 80% acetic acid was applied to the serosal surface of the stomach. After 1 min, acetic acid was aspirated, the stomach washed with sterile saline and replaced, the abdomen was sutured and then rats returned to their cages. Following the surgery, animals were fasted for 24 h and on second day after ulcer induction, they received restricted feed twice a day for 1 h until the end of experiment. Animals were orally treated twice daily 1 h after feeding, with water (Control, C: 1 mL/kg), omeprazole (O: 40 mg/kg) or with E50 (0.003, 0.03 and 0.3 mg/kg) during 5 days.

On the day following the last treatment, rats were euthanized and the stomach was removed and opened for calculate the ulcer area (mm2), measured as length (mm) × width (mm). The ulcerated gastric tissue was fixed in ALFAC solution (85 % alcohol 80 °GL, 10 % of formaldehyde at 40 % and 5 % glacial acetic acid), dehydrated with alcohol and xylene and embedded in paraffin. After that, ulcer tissue was cut into 5-µm sections on a microtome, placed in glass slides and stained with hematoxylin/eosin (HE) for histological evaluation. The ulcers sections were observed and photographed using a slide scanner (Meta Viewer Version 2.0 20X, MetaSystems, North Royalton, OH, USA).

2.11. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the means (S.E.M.) (n = 6-8 animals per group). Statistical comparisons were analyzed with one-way ANOVA followed by Bonferroni's multi-comparison post-hoc test, using the GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). In all cases, differences were considered to be significant when $P \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Isolation and structural analysis of the polysaccharides from *C. sylvestris* leaves

Polysaccharides were obtained from infusion of *C. sylvestris* leaves (567 g) and were fractionated according to Fig. 1. The crude polysaccharides precipitate obtained after treatment with excess EtOH (CP; 12.0 g) was submitted to freeze-thawing until no more precipitate appeared. The soluble portion (SCS; 2.80 g) presented a heterogeneous elution profile on HPSEC-RI analysis (Fig. 2) and was fractionated by dialysis at a 100 kDa cut-off membrane, resulting in a retained (R100; 0.28 g) and an eluted fraction (E100; 1.91 g). The R100 fraction presents a single peak on HPSEC-RI, whereas E100 was subjected to a new dialysis, now at a 50 kDa cut-off membrane, to give a retained (R50; 0.33 g) and an eluted fraction (E50; 1.57 g). The latter eluted as a single peak on HPSEC-RI (Fig. 2).

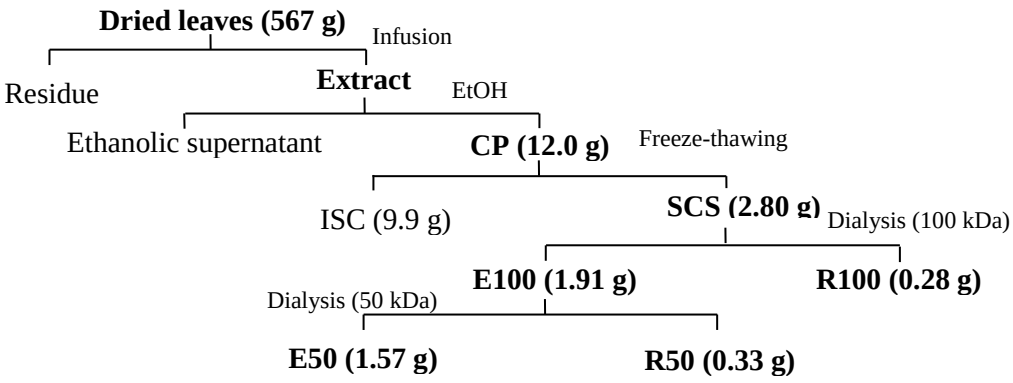


Fig. 1**.** Flowchart of the extraction and fractionation of polysaccharides from *Casearia sylvestris* leaves.

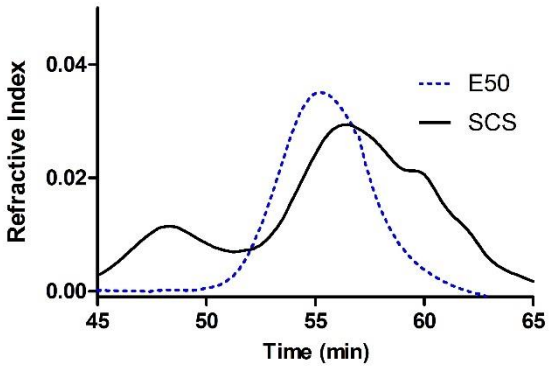


Fig. 2. Elution profiles of SCS and E50 on HPSEC, using RI detection.

R100 contained galactose, arabinose, glucose, and rhamnose in a 23:21:4:1 molar ratio, R50 contained galactose, arabinose, glucose, manose, and rhamnose in a 8:2:2:1:1 molar ratio, while E50 showed galactose, arabinose, glucose, and rhamnose in a 2:5:6:1 ratio. In TLC analysis of the monosaccharide mixture obtained after acid hydrolysis, only R100 indicated the presence of acid monosaccharides (galacturonic acid). Fractions R50 and E50 contained only neutral polysaccharides.

The soluble polysaccharide fraction that presented the highest yield (E50) was structurally analyzed. It had M_w 22,440 g/mol (dn/dc = 0.211) and its methylation analysis (Table 1) showed presence of 3- and 5-linked Ara*f* units, in accordance with the formation of alditol acetates of 2,5-Me_2-Ara (4.5%), 2,3-Me_2-Ara (3.0%), moreover, 3-, 6-, and 3,6-linked Gal*p* units were observed, as demonstrated by the presence of alditol acetates of

2,4,6-Me_3-Gal*p* (2.1%), 2,3,4-Me_3-Gal*p* (8.2%), and 2,4-Me_2-Gal*p* (3.3%) suggesting the presence of type II arabinogalactan and/or arabinan in E50 [38, 31].

Table 1. Profile of partially O-methylated alditol acetates and monosaccharide structures of E50.

***O*-Me-alditol acetate**	**Linkage**	**%**
2,3,5-Me_3-Ara	Ara*f*-(1→	11.6
2,5-Me_2-Ara	→3)-Ara*f*-(1→	4.5
2,3-Me_2-Ara	→5)-Ara*f*-(1→	3.0
2,3,4-Me_2-Rha	Rha*p*-(1→	12.0
2-Me_2-Rha	→3,4)-Rha*p*-(1→	1.1
4-Me-Rha	→2,3)-Rha*p*-(1→	3.0
2,3,4,6-Me_4-Gal	Gal*p*-(1→	11.0
2,4,6-Me_3-Gal	→3)-Gal*p*-(1→	2.1
2,3,4-Me_3-Gal	→6)-Gal*p*-(1→	8.2
2,4-Me_2-Gal	→3,6)-Gal*p*-(1→	3.3
2,3,4,6-Me_4-Glc	Glc*p*-(1→	33.0
2,3,6-Me_3-Glc	→4)-Glc*p*-(1→	1.2
2,3,4-Me_3-Glc	→6)-Glc*p*-(1→	6.0

Type II arabinogalactans are constituted by backbones of (1→6)-linked Gal*p* units, and short branches of (1→3)-linked Gal*p* units at *O*-6. The most of the remaining O-3 and O-6 positions of the Gal*p* units are substituted by terminals of Ara*f*, 5- and/or 3,5-linked Ara*f* units [39, 40, 41]. Moreover, the 2-Me-Rha*p* (1.1%) and 4-Me-Rha*p* (3.0%) derivatives demonstrated the presence of 3,4- and 2,3-linked Rha*p* units, and the 2,3,6-Me_3-Glc*p* (1.2%) and 2,3,4-Me_3-Glc*p* (6.0%) derivatives were of 4- and 6-linked Glc*p* units. The high content of non-reducing terminals of glucose (33.0%), rhamnose (12.0%), galactose (11.0%) and arabinose (11.6%) are in disagreement with the amount of branching points observed in the polysaccharide fraction E50 (7.4%). Therefore, these

results need to be further confirmed, but the presence of type II arabinogalactan and/or arabinan in the fraction is notable.

HSQC spectrum of E50 (Fig. 3) showed $^{13}C/^{1}H$ correlations at δ 103.6/4.51 and 103.0/4.46 of (C-1/H-1), 76.9/3.95 (C-3/H-3 substituted), and 66.7/3.84 (C-6/H-6 substituted) of β-D-Gal*p* units of type II arabinogalactan [36, 42, 43]. C-1/H-1 correlations of non-reducing terminals of α-L-Ara*f* of the type II arabinogalactan was observed at δ 108.7/5.22 ppm, while those at δ 107.5/5.08 and 106.9/5.13 were from substituted α-L-Ara*f* units of the arabinan chains [36, 42, 43].

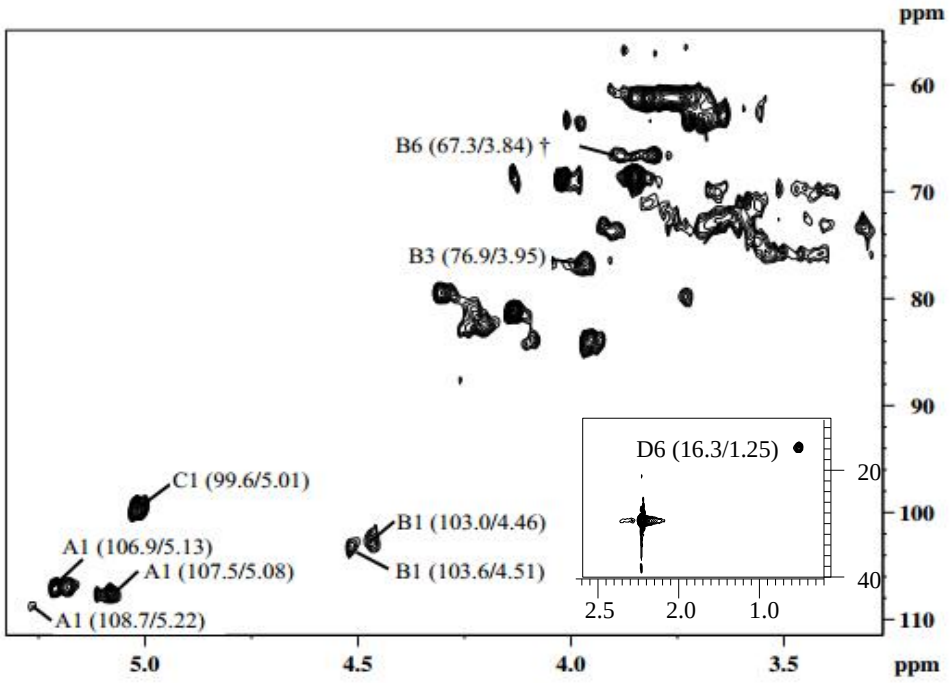


Fig. 3**.** $^{13}C/^{1}H$ HSQC-DEPT of E50. Solvent D_2O at 70 ºC; numerical values are in δ ppm. A (α-D-Ara*p*), B (α-D-Gal*p*), C (α-L-Glc*p*), D (α-L-Rha*p*) The letters are followed by the carbon number of the monosaccharide unit. † Inverted signals representing C-6/H-6.

The results obtained from NMR analysis confirmed the presence of type II arabinogalactan and arabinan in the polysaccharide fraction E50. The intense C-1/H-1 correlation observed at δ 99.6/5.01 probably is from the Glc units of E50.

3.2. Anti-ulcer activity

The present investigation was on the structural characterization of a polysaccharide belonging to a class of polymers whose several studies have been demonstrated the antiulcer activity [27, 44, 45, 46]. This activity was determined for oral administration of crude polysaccharide (CP) isolated from of *C. sylvestris* leaves. Doses of 0.003, 0.03 and 0.3 mg/kg of CP significantly reduced, not in a dose-dependent manner, acute gastric ulceration induced by ethanol in 46, 63 and 55%, respectively. The positive control for ulcer prevention, omeprazole (40 mg/kg), reduced the gastric ulcer size by 90% when compared to control group (C: 75.82 ± 11.48 mm²) (Fig. 4).

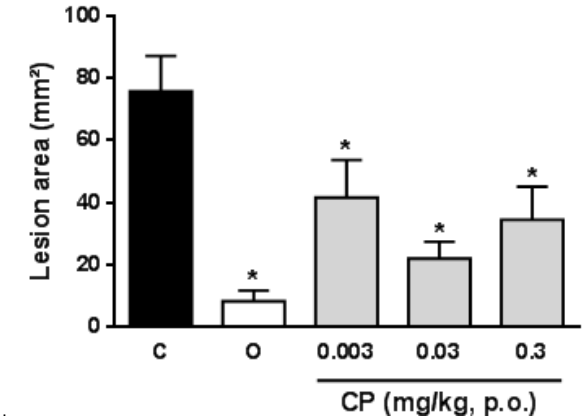


Fig. 4**.** Effect of oral pretreatment with crude polysaccharide (CP) from *C. sylvestris* leaves on acute gastric ulcers induced by ethanol in rats. The animals were orally treated with vehicle (C: water 1 mL/kg), Omeprazole (O: 40 mg/kg) or CP (0.003, 0.03 and 0.3 mg/kg) 1 h before oral administration of ethanol P.A. (1 mL/animal). The results are expressed as mean ± S.E.M. *P <0.05 when compared to control group (C).

The ethanol-induced gastric lesions are a well-characterized model that comprises widespread damage of the glandular mucosa, observed macroscopically due to the

hemorrhagic and necrotic aspects of ulcer injury [37]. As previously reported, it has been shown that polysaccharides derived from medicinal plants may decrease the gastric mucosal damage induced by ethanol [36, 42, 47]. Similarly, polysaccharide fractions obtained from CP (ISC: 0.2 mg/kg; R100: 0.005 mg/kg; E50: 0.03 mg/kg and R50: 0.006 mg/kg) also were evaluated to investigate which protect against gastric damage induced by ethanol. In this experiment, the ethanol promoted a typical widespread gastric lesion that covered 161.1 ± 24.69 mm² of total stomach area of control group. Only oral pretreatment with ISC (0.2 mg/kg) and E50 (0.03 mg/kg) significantly reduced the ethanol evoked gastric lesions in 72% e 63%, respectively, resembling omeprazole data (89%), while R100 and R50 not showed gastroprotective activity (Fig. 5A).

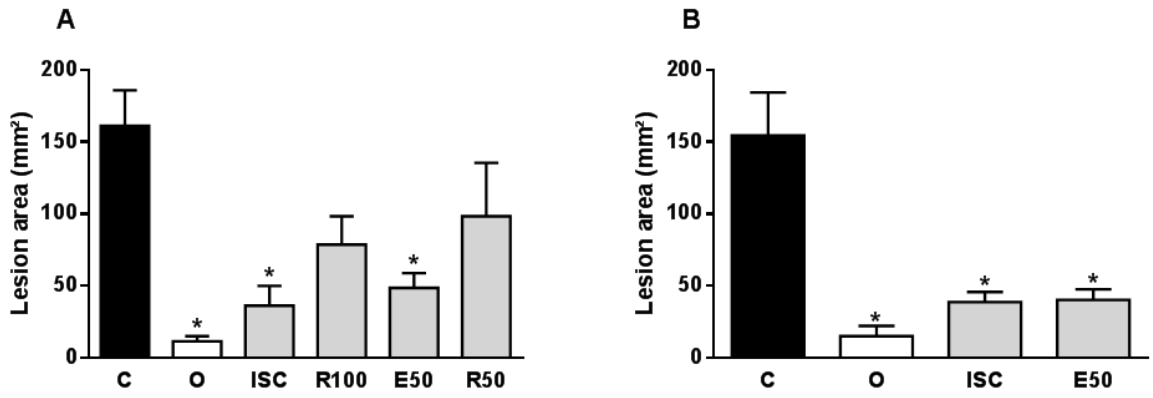


Fig. 5**.** Effect of pretreatment with polysaccharide fractions (ISC, R100, E50, R50) obtained from CP of *C. sylvestris* leaves on acute gastric ulcers induced by ethanol in rats. (A) The animals were treated orally with vehicle (C: water 1 mL/kg), Omeprazole (O: 40 mg/kg), ISC (0.2 mg/kg), R100 (0.005 mg/kg), E50 (0.03 mg/kg) or R50 (0.006 mg/kg) 1 h before oral administration of ethanol P.A. (1 mL/animal). (B) The animals were treated by intraperitoneal route with vehicle (C: water 1 mL/kg), Omeprazole (O: 40 mg/kg), ISC (0.02 mg/kg) or E50 (0.003 mg/kg) 0.5 h before oral administration of ethanol P.A. The results are expressed as mean ± S.E.M. * P <0.05 when compared to control group (C).

To discard that the gastroprotection promoted by oral administration of ISC and E50 were due to the formation of a physical barrier on the gastric mucosa, we pretreated the animals by intraperitoneal route. Likewise, intraperitoneal administration of ISC (0.02 mg/kg) and E50 (0.003 mg/kg) significantly reduced the formation of ethanol-induced gastric lesions in 83% and 84%, when compared to control group (C: 154.4 ± 29.83 mm^2) (Fig. 5B). Interestingly, although the exact mechanism underlie gastroprotective activity is unknow, it is possible discard that ISC and E50 suppresses the development of gastric mucosal damage acting as sucralfate, a well know gastroprotective drug which exerts a local effect forming a antiulcer adherent barrier [48].

Usually, in addition to sucralfate, drugs currently available for the treatment of gastric ulcers include proton pump inhibitors such as omeprazole and histamine H2-receptor antagonists such as ranitidine [49]. However, the long-term therapy with these antisecretory drugs is strong associated to side effects, such as iron and calcium deprivation that causes nutritional deficiencies, increasing the risk of anemia and bone fractures, respectively [50, 51]. In addition, it is well know that the stomach mucosa treated for gastric ulceration frequently did not return completely to a normal state, which could account to an ineffective ulcer healing process [52]. Therefore, based on the results of previous studies [47], new strategies involving the use of natural products such as polysaccharides could reduce the side effects and improve the treatment of gastric ulcers.

Additionally, it is important to mention that toxicology studies concluded the *C. sylvestris* is safe for use over a long period [3], and considering this aspect, we decide evaluated the ulcer healing property of the E50 fraction in the acetic acid chronic ulcer model. Seven days after acetic ulcer induction, both macroscopic and microscopic examination revealed the presence of a crater in the glandular ulcer site of stomach (Fig. 6A), reinforce the severity of gastric mucosal damage induced by acetic acid in the control

group. Oral administration of E50 (0.003, 0.03 and 0.3 mg/kg, twice a day for 5 days) reduced the gastric ulcer induced by acetic acid in 49, 66 e 80%, respectively, when compared to control group (141 ± 20.4 mm^2). The positive control employed, Omeprazole (40 mg/kg, p.o.), also reduced the gastric ulcer size in 78%, when compared to ulcerated group (Fig. 6C). In accordance with the macroscopic examination, the histological analysis showed that the animals chronically treated with E50 (0.3 mg/kg; Fig. 6B) exhibited gastric tissue healing when compared with the control group (Fig. 6A).

Representative macroscopic and histological data regarding omeprazole and E50 at 0.003 and 0.03 mg/kg are not shown.

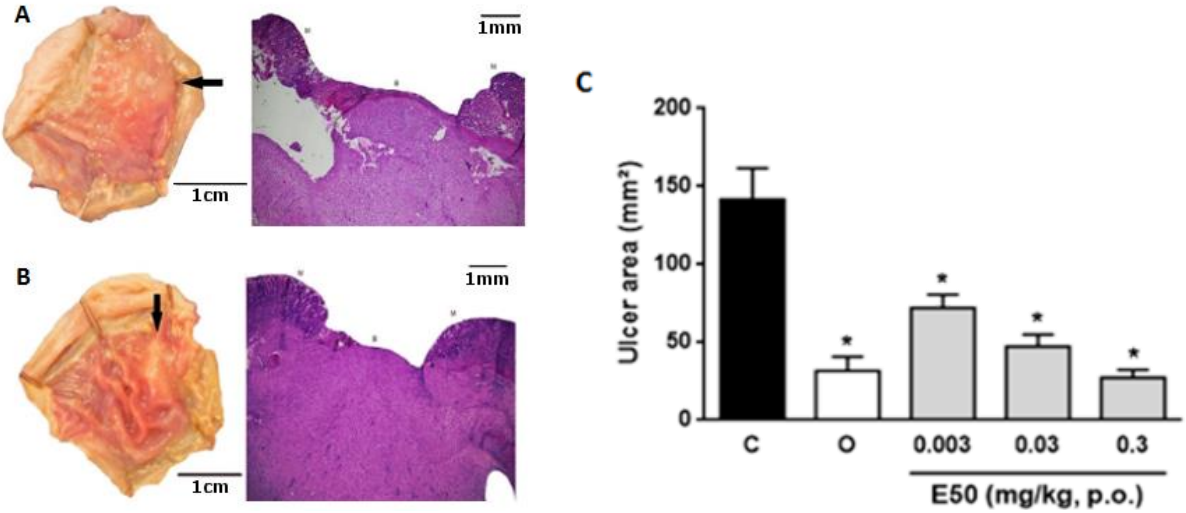


Fig. 6**.** Effect of treatment with polysaccharide fraction E50 obtained from CP of *C. sylvestris* leaves on chronic gastric ulcers induced by 80% acetic acid in rats. (A) Representative macroscopic photograph and histological hematoxylin/eosin (HE) sections of stomachs of control groups. (B) Representative macroscopic photograph and histological hematoxylin/eosin (HE) sections of stomachs of E50 0.3 mg/kg groups. (C) Gastric ulcers areas (mm^2) of animals orally treated with vehicle (C: water 1 mL/kg),

Omeprazole (O: 40 mg/kg) and E50 (0.003, 0.03 and 0.3 mg/kg). The results are expressed as mean ± S.E.M. * P <0.05 when compared to group control (C).

In the ethanol-induced ulcer model, is possible to study acute gastric lesions, which resembles a hemorrhagic gastritis. Nevertheless, in the chronic gastric ulcer model induced by acetic acid, the erosion persists for a long time and is characterized by a scar formation, quite resembling the human chronic ulcer condition taking into account its pathological features and healing mechanisms [53]. In a previous study working with *in vitro* conditions, Zippel et al. [54] demonstrated that the polysaccharide arabinogalactan, isolated from *Mimosa tenuiflor*, presented healing activity, increasing the dermal fibroblast activity levels and its proliferation.

4. Conclusions

In this study was showed that polysaccharides from infusion of *C. sylvestris* leaves avoid formation of ethanol-induced ulcers and accelerate the healing of acetic acid-induced ulcers, demonstrating the gastroprotective potential of polysaccharides, and associating the pharmacological effect of *C. sylvestris* with this class of compounds.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Grant number 449176/2014-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação Araucária for financial support; and UFPR-RMN Center for the NMR analyses.

5. References

[1] A.C. Basile, JÁ. Sertié, S. Panizza, TT. Oshiro, C.A. Azzolini, Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*, I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract, J Ethnopharmacol. 30 (1990) 185-197.

[2] JAA. Sertié, JCT. Carvalho, S. Panizza, Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*, Pharm Biol. 38, (2000) 112-119.

[3] A.Z. Ameni, O.A. Latorre, L.M.B. Torres, S.L. Górniak, Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS), J Ethnopharmacol. 175 (2015) 9–13.

[4] F.G. Camargo, J.A. Pereira, V.S. Bueno, E. Gomes, T. Ando, Ação do extrato alcoólico de guaçatonga diluído e tamponado em subcutâneo de camundongo: Parte II: estudo histológico. *Lecta –USF*. 14 (1996) 61-86.

[5] I. Esteves, L.M. Lima, M.L. Silva, L.S. Santos, M. Rodrigues, J.M.S. da Silva, F.F. Perazzo, J.C.T. Carvalho, *Casearia sylvestris* Sw essential oil activity in inflammation in rats induced by bothropsalternatus venom, Int J Pharm Sci Rev Res, 7 (2011) 28–32.

[6] M.N. Albano, M.R. Silveira, L.G. Danielski, D. Florentino, F. Petronilho, Piovezan, A.P, Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), J Ethnopharmacol. 147 (2013) 612-617.

[7] E.S. Mattos, M.J.S. Frederico, T.D. Colle, D.V. de Pieri, R.R. Peters, A.P. Piovezan, Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action, J Ethnopharmacol. 112 (2007) 1-6.

[8] F.G. Camargo, E. Gomes, E. Pannunzio, V.S. Buenos, Ação do extrato alcoólico de guaçatonga (*C. svlestris*) em subcutâneo de camundongo - Parte I. Estudo Histológico. *Lecta-USF*. 13, (1995) 47-68.

[9] J.E.O. Medeiros, J.A.P. Catelli, M. Flores, Avaliação da ação cicatrizante da guaçatonga (*Casearia sylvestris Sw*.) em feridas experimentalmente induzidas em camundongos alves, Nucleus Animalium, 8 (2016)15-20.

[10] E.P. Campos, L.N. Trombini, R. Rodrigues, D.L. Portella, A.C. Werner, M.C. Ferraz, R.V. de Oliveira, J.C. Cogo, Y. Oshima-Franco, N. Aranha, M. Gerenutti, Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents, BMC Res Notes. 8, (2015) 269.

[11] M.L. Mesquita, J.E. de Paula, C. Pessoa M.O. de Moraes, L.V. Costa-Lotufo, R. Grougnet, S. Michel F. Tillequin, L.S. Espindola, Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines, J Ethnopharmacol. 123 (2009) 439-445.

[12] P.M. Ferreira, A.G. Santos, A.G. Tininis, P.M. Costa, A.J. Cavalheiro, V.S. Bolzani, M.O. Moraes, L.V. Costa-Lotufo, R.C. Montenegro, C. Pessoa, Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. Chem Bio Interac, 188, (2010) 497-504.

[13] S.L., Silva, J.S. Chaar, P.M.S. Figueiredo, T. Yano, Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* on human cancer cells and erythrocytes, Acta Amaz. 38 (2008) 107-112.

[14] H. Itokawa, N. Totsuka, H. Morita, K. Takeya, Y. Iitaka, E.P. Schenkel, M. Montidome, New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). Chem Pharm Bull. 38 (1990) 384-388

[15] N.H. Oberlies, J.P. Burgess, H.A. Navarro, R.E. Pinos, C.R. Fairchild, R.W. Peterson, D.D. Soejarto, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, M.C. Wani, M.E. Wall, Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*, J. Nat. Prod. 65 (2002) 95-99.

[16] G.A. Ferreira-Silva, C.C.L. Lages, P. Sartorelli, F.R. Hasegawa, M.G. Soares, M. Ionta, Casearin D inhibits ERK phosphorylation and induces downregulation of cyclin D1 in HepG2 cells. Toxicol. in Vitro, 38 (2017) 27–32.

[17] P.M.P. Ferreira, D.P. Bezerra, J.N. Silva, M.P. Costa, R.O. Ferreira, N.M.N. Alencar, I.S.T. Figueiredo, A.J. Cavalheiro, C.M.L. Machado, R. Chammas, A.P.N.N. Alves, M.O. Moraes, C. Pessoa, Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations, J Ethnopharmacol. 186 (2016) 270–279.

[18] P.R. Menezes, E.A. Schwarz, C.A.M. Santos, *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. Fitoterapia, 75 (2004) 398-400.

[19] E.J.F. Araújo, G.A.L. Oliveira, L.Q. Sousa, V.S. Bolzani, A.J. Cavalheiro, A.R. Tome, A.P. Peron, A.G. Santos, A.M.G.L. Citó, C. Pessoa, R.M. Freitas, P.M. Ferreira, Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins, An. Acad. Bras Ciênc, 87 (2015) 1791-1807.

[20] I. Esteves, I.R. Souza, M. Rodrigues, L.G. Cardoso, LS. Santos, Sertie, JÁ., Perazzo, FF., Lima, L.M., Schneedorf, J.M., Bastos, J.K., Carvalho, J.C. Gastric antiulcer and anti-

inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. J Ethnopharmacol. 101 (2005)191-196.

[21] A.S. Tarnawski, Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal, Ulcer Healing Dig Dis Sci. 50 (2005) 24-33.

[22] F.A. dos Reis Lívero, L.M. da Silva, D.M. Ferreira, L.F. Galuppo, D.G. Borato, T.B.L. Prando, A. Acco, Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 389 (2016) 985-998.

[23] F. B. Potrich, A. Allemand, L. M. da Silva, A. C. dos Santos, C. H. Baggio, C. S. Freitas, D.A Mendes, E. Andre, M.F. Werner, M.C.A. Marques, Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. J Ethnopharmacol. 130 (2010) 85-92.

[24] S.S. Fialho, G.M. Nogueira, C.A. Duarte, A.O. Paiva Neto, D.G. Macoris, *Casearia sylvestris* na permeabilidade gástrica à sacarose em equinos submetidos a protocolo de indução de úlcera gástrica, Ciênc. Rural, 40 (2010) 2.

[25] L.M.C. Cordeiro, V.F. Reinard, C.H. Baggio, M.F.P. Werner, L.M. Burci, G.L. Sassaki, M. Iacomini, Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (Chenopodium quinoa) seeds: Structure and gastroprotective activity. Food Chem, 130 (2012) 937-944.

[26] T.M. Cantu-Jungles, D. Maria-Ferreira, L.M. Silva, C.H. Baggio, M.F.D. Werner, M. Iacomini, L.M.C. Cordeiro, Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins, Food Chem, 146, (2014) 492-499.

[27] T.R. Cipriani, C.G. Mellinger, L.M. de Souza, C.H. Baggio, C.S. Freitas, M.C. Marques, P.A. Gorin, G.L. Sassaki, M. Iacomini, A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects, J. Nat Prod. 69 (2006) 1018–1021.

[28] A.M. Nascimento, L.M. Souza, C.H. Baggio, M.F.P. Werner, D. Maria-Ferreira, LM. Silva, GL. Sassaki, PA.J. Gorin, M. Iacomini, T.R. Cipriani, Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*, Phytochemistry. 85 (2013) 137–142.

[29] P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalia usnea*. Carbohydr Res, 128 (1984) 119-131.

[30] G.L. Sassaki, L.M. Souza, T.R. Cipriani, M. Iacomini, TLC of carbohydrates, in: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (Eds.), Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, CRC Press, Boca Raton, 2008, pp. 255-276.

[31 F.A. Pettolino, C. Walsh, G.B. Fincher, A. Bacic, Determining the polysaccharide composition of plant cell walls, Nat Protoc. 7 (2012) 1590-1607.]

[32] F. Ciucanu., A. Kerek, Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, Carbohydr Res. 131 (1984) 209-217.

[33] J. F. Saeman, W. E. Moore, R. L. Mitchell, M. A. Millet, Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. Technical Association of Pulp and Paper Industry, 37, (1954) 336-343.

[34] G.L. Sassaki, P.A. Gorin, L.M. Souza, P.A. Czelusniak, M. Iacomini, Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative

activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation, Carbohydr Res. 340 (2005) 731-739.

[35] A. Robert, J.E. Nezamis, C. Lancaster, A.J. Hanchar, Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury, Gastroenterology. 77 (1979) 433–443.

[36] A.M. Nascimento, D. Maria-Ferreira, E.F.J. de Souza L.M. de Souza, G.L. Sassaki, M. Iacomini, M.F. Maria, T.R. Cipriani, Gastroprotective effect and chemical characterization of a polysaccharide fraction from leaves of *Croton cajucara*, Int. J. Biol. Macromolec. 95 (2017) 153–159.

[37] S. Okabe, J.L. Roth, C.J. Pfeiffer, A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats, Ame J Dig Dis. 16 (1971) 277–284.

[38] D. Mohnen, Pectin structure and biosynthesis, Curr Opin Plant Biol. 11 (2008) 266-277.

[39] G.B. Fincher, B.A. Stone, A.E. Clarke, Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function, Annu Rev Plant Biol. 34 (1983) 47-70.

[40] N.C. Carpita, D.M. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, Plant J. 3 (1993) 1-30.

[41] P. Capek, An arabinogalactan containing 3-O-methyl-D-galactose residues isolated from the aerial parts of Salvia officinalis L. Carbohydr Res. 343 (2008) 1390–1393.

[42] J. Carlotto, L.M. de Souza, C.H. Baggio, M.F.P. Werner, D. Maria-Ferreira, G.L. Sassaki, M. Iacomini, T.R. Cipriani, Polysaccharides from *Arctium lappa* L.: Chemical structure and biological activity, Int J Biol Macromol, 91 (2016) 954–960.

[43] C.L. Delgobo, P.A.J. Gorin, C. Jones, M. Iacomini, Gum heteropolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharides of Anadenanthera colubrine, Phytochemistry. 47 (1998) 1207-1214.

[44] L.Y.A.A. Tanaka, J.B. Oliveira, J.E. Gonçalves, T.R. Ciprianic, L.M. de Souza, M.C.A. Marques, M.F.P. Wernerd, C.H. Baggio, P.A.J. Gorin. G.L. Sassaki, M. Iacomini, An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. Carbohydr Polym. 82 (2010) 714–721.

[45] C.S. Nergard, D. Diallo, K. Inngjerdingen, T.E. Michaelsen, T. Matsumoto, H. Kiyohara, Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: Anti-ulcer-, radical scavenging and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots, J Ethnopharmacol. 96 (2005) 255–269.

[46] T.R. Cipriani, C.G. Mellinger, M.L.C. Bertolini, C.H. Baggio, C.S. Freitas, M.C.A. Marques, P.A.J. Gorin, G.L. Sassaki, M. Iacomini, Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal, Food Chem. 115 (2009) 687–690.

[47] D. Maria-Ferreira, L.M. da Silva, D.A.G.B. Mendes, D.A. Cabrini, A.M. Nascimento, M. Iacomini, T.R Cipriani, A.R.S. Santos, M.F.P Werner, C.H Baggio. Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen: gastroprotective and ulcer healing properties in rats, Plos One. 9 (2014) e84762.

[48] S.P. Sulochana, M. Syed, D.V. Chandrasekar, R. Mullangi, N.R. Srinivas, Clinical drug-drug pharmacokinetic interaction potential of sucralfate with other drugs: review and perspectives, Eu J Drug Metab Pharmacokinet. 41 (2016) 469–503.

[49] P. Malfertheiner, F.K. Chan, K. EL McColl, Peptic ulcer disease, Lancet. 24, (2009) 374.

[50] T. Ito, R. Jensen, Association of long-term proton pump inhibitor therapy with bone fractures and effects on absorption of calcium, vitamin b12, iron, and magnesium, Curr Gastroenterol. 12 (2011) 448–457.

[51] J.R. Lam, J.L. Schneider, C.P. Quesenberry, D.A. Corley, Proton pump inhibitor and histamine-2 receptor antagonist use and iron deficiency, Gastroenterol. (2016) pii: S0016-5085(16)35392.

[52] M.H. Portheus, H.H.S Public Access, 1 (2016) 23-30. Doi:10.1007/s40778-014-0003-z. Genome.

[53] S. Okabe, K. Amagase, An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research, Biol Pharm Bull. 28 (2005) 1321–1341.

[54] J. Zippel, A. Deters, A. Hensel, Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd). Poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes, J Ethnopharmacol. 124 (2009) 391–396.

4. RESULTADOS COMPLEMENTARES

A seção de resultados complementares tem como objetivo adicionar resultados que não foram incluídos nos artigos científicos redigidos até o momento, que estão dentro dos objetivos propostos de caracterização química de polissacarídeos das plantas em estudo.

4.1. Material de Estudo

As folhas de *C. sylvestris* foram coletadas na cidade de Curitiba-PR, na região da Mata Atlântica brasileira e identificadas no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná. As folhas de *S. dendroideum* foram adquiridos na região metropolitana de Curitiba, e sua identificação foi realizada no Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba. As folhas para a extração de polissacarídeos foram separadas, lavadas e secas ou liofilizadas. No caso da *C. sylvestris*, a secagem foi realizada em estufa com circulação de ar a 45 ºC, por 2 dias e, para o *S. dendroideum*, as folhas foram liofilizadas. Após a secagem as folhas de ambas as plantas foram trituradas com auxílio de um liquidificador.

4.2. Extração, fracionamento e purificação de polissacarídeos

4.2.1 Extração de polissacarídeos

As folhas secas e trituradas (567 g de *C. sylvestris* e 1.25 kg de *S. dendroideum*) foram submetidas à extração por infusão, utilizando uma proporção de 10 g de amostra para cada 100 mL de água. Após o resfriamento da infusão até a temperatura ambiente, o extrato aquoso (infuso) foi filtrado e concentrado em rotaevaporador até um volume menor (100 mL). O material concentrado foi tratado com 3 volumes de etanol, deixado em repouso no freezer por 24 h, e centrifugado (10.000 rpm /15 min a 10 °C). O material

precipitado foi solubilizado em água e dialisado, contra água corrente, utilizando membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa, por 2 dias, e liofilizado.

4.2.2. Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo

As frações polissacarídicas foram solubilizadas em pequeno volume de água e, então, submetidas ao congelamento e posterior descongelamento à temperatura ambiente. O precipitado (insolúvel em água fria) foi separado do sobrenadante por centrifugação (9.000 rpm / 15 min a 10 ºC). Esse processo foi repetido até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado após congelamento e descongelamento (GORIN e IACOMINI, 1984). Após essas etapas, as frações sobrenadante solúvel e precipitada insolúvel foram concentradas em rotaevaporador e liofilizadas.

4.2.3 Fracionamento por diálise.

A fim de separar polissacarídeos por tamanho, as frações polissacarídicas foram submetidas à diálise com membranas de limite de exclusão de diferentes tamanhos (100 e 50 kDa), sob sistema fechado, durante 3 dias, com 2 trocas diárias de água destilada. Tanto os eluídos quanto os retidos provenientes das diálises foram concentrados em rotaevaporador, liofilizados.

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Composição monossacarídica

As composições monossacarídicas foram determinadas após a hidrólise de aproximadamente 2 mg dos polissacarídeos, com 1 mL de TFA (ácido trifluoroacético) 1 mol/L, a 100 ºC em estufa, por 16 h. As soluções foram evaporadas e o resíduo dissolvido em 1 mL de água destilada, sendo que uma pequena fração foi analisada por

cromatografia de camada delgada (TLC). Ao restante do material foram adicionados 2 mg $NaBH_4$. Após 18 h, o material foi neutralizado com ácido acético, e as soluções foram evaporadas, e o boro foi removido como borato de trimetila por repetidas evaporações com metanol (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v; 1 mL), à temperatura ambiente, *overnight*. As reações de acetilação foram interrompidas com gelo e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio, o qual foi lavado diversas vezes com solução aquosa de $CuSO_4$ a 5% para a eliminação da piridina residual. A fase clorofórmica foi, então, filtrada e evaporada à temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons.

4.3.2 Metilação dos polissacarídeos isolados e análise na forma de acetatos de alditóis

Os polissacarídeos foram metilados pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). O polissacarídeo foi solubilizado em Me_2SO (1 mL). Excesso de NaOH triturado e seco foi adicionado à solução, seguido pela adição de CH_3I (1 mL), agitação em vórtex por 30 min e repouso por 24 h. A metilação foi interrompida com água destilada sob banho de gelo e a solução neutralizada com ácido acético. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água destilada. A fase clorofórmica foi evaporada e o material hidrolisado com H_2SO_4 72% (v/v; 0,250 mL) por 1h a 0 ºC, seguido pela adição de 2,0 mL de água destilada e aquecimento a 100 ºC por 16 h (SAEMAN et al., 1954). O material hidrolisado com H_2SO_4 foi neutralizado com $BaCO_3$, filtrado, reduzido com $NaBD_4$ e acetilado como descrito acima (item 4.3.1). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelos

seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976; SASSAKI et al., 2005).

4.3.3 Carboxirredução

O processo de carboxirredução foi realizado segundo Taylor e Conrad (1972). O polissacarídeo foi dissolvido em tampão MES [ácido 2-(Nmorfolina)-etanosulfônico] (0,2 mol/L, pH 4,75, 10 mL) e a este foram adicionados, pouco a pouco e sob agitação, 24 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida] para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A mistura de reação permaneceu sob agitação por 2 h. Em seguida, foi adicionado tampão TRIS (2 mol/L, pH 7,0) até pH 7,0 (5 mL) e, posteriormente, $NaBH_4$. Durante a adição do $NaBH_4$, o pH do meio foi controlado em 7,0 pela adição de HCl diluído. Após 14 h, a redução foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5,0. O material foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa, concentrado em rotaevaporador e liofilizado.

4.3.4 Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). O polissacarídeo foi solubilizado em solução de NaOH 0,5%, em uma concentração de 1 mg/mL. Desta solução, foi utilizado 0,4 mL de amostra, sobre a qual foram adicionadas 40 µL de solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 mol/L (pH 1,6). Em seguida, foram adicionados 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mmol/L em ácido sulfúrico). A solução foi agitada em vórtex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após resfriar os tubos até a temperatura ambiente, adicionaram-se 80 µL de metahidroxibifenila (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v) e agitou-se novamente em vórtex. A presença de ácidos urônicos é visualizada pelo aparecimento de uma coloração rósea.

A sensibilidade do método é de 0,97-38,8 µg de ácido urônico (em 0,4 mL de amostra), com leitura em 525 nm, utilizando o ácido galacturônico como padrão.

4.3.5 Homogeneidade e determinação da massa molar

Para a determinação de massa molar e ensaios de homogeneidade foram utilizados o aparelho da Wyatt Technology, equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC), com quatro colunas de gel permeação em série, com limites de exclusão de 7.10^6, 4.10^5, 8.10^4 e 5.10^3 Da, um detector de índice de refração, modelo Waters 2410. O eluente utilizado foi solução de $NaNO_2$ (0,1 mol/L) contendo NaN_3 (0,2 g/L), com fluxo controlado de 0,6 mL/min. As amostras foram solubilizadas na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL e filtradas através de membrana de acetato de celulose com diâmetro médio dos poros de 0,22 µm. As amostras (100 µL) foram injetadas e os resultados foram obtidos com o software ASTRA 4.70.07.

Para o cálculo da massa molar foi determinado o valor de *dn*/*dc* (taxa de variação do índice de refração em relação à concentração) para as amostras que apresentaram um perfil homogêneo de eluição. As amostras foram solubilizadas em solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL e filtradas através de membrana de acetato de celulose com diâmetro médio dos poros de 0,22 µm. Elas foram diluídas nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL e analisadas utilizando-se apenas o detector de índice de refração, com as colunas desacopladas. O fluxo do solvente foi de 0,1 mL/min, e os resultados obtidos foram analisados com o software ASTRA 4.70.07.

4.3.6 Cromatografia em camada delgada (TLC - *Thin Layer Chromatography*)

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para verificar a presença de ácidos urônicos nos polissacarídeos. As análises foram realizadas com os polissacarídeos

hidrolisados, em placas de sílica gel 60G (MERCK) com 8 cm de altura total. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetato de etila: ácido acético: n-propanol: água (4:2:2:1, v/v), e o revelador foi uma solução de orcinol:H_2SO_4 (0,2 g de orcinol, em 95 mL de etanol e 5 mL de H_2SO_4) (SASSAKI et al., 2008).

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

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa foi realizada em cromatógrafo Varian Saturn 2000R - 3800 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 2000R ou 4000R, utilizando a coluna capilar VFS MET (30 m x 0,25 mm i.d.) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 mL/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis e os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados a uma temperatura de 100 - 280 °C (10 °C/min).

4.3.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Análises de $^{13}C/^{1}H$-HSQC-DEPT foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance-III 600 MHz e Avance HD 400 MHz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram analisadas em uma sonda inversa de 5 mm de diâmetro interno, na temperatura de 70 ºC. Os polissacarídeos foram solubilizados em D_2O. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e acetona (δ 30,2/2,22, $^{13}C/^{1}H$) foi utilizado como padrão interno.

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1 *Casearia sylvestris*

Neste tópico é relatada a fração R100, da qual foram obtidos resultados relevantes quanto à composição química e estrutural.

Os polissacarídeos foram obtidos por infusão das folhas secas (567 g) de *C. sylvestris*. O extrato gerado foi tratado com etanol (3 volumes), e a fração precipitada (12,0 g) foi submetida a fracionamento por congelamento e descongelamento (GORIN e IACOMINI, 1984). A fração solúvel em água fria (SCS 2,80 g) foi, então, submetida a fracionamento por diálise em membrana com limite de exclusão de 100 kDa, gerando as frações R100 (0,28 g) e E100 (1,91). Devido a heterogeneidade da fração E100, esta foi eluída em membrana de 50kDa, gerando por sua vez, as frações R50 (1,57 g) e E50 (0,33 g) (Fig.1). Todos os fracionamentos foram acompanhados por análises de HPSEC (cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência) a fim de verificar o padrão de separação das moléculas. As frações R100 e E50 mostraram um perfil homogêneo em HPSEC (Fig 2).

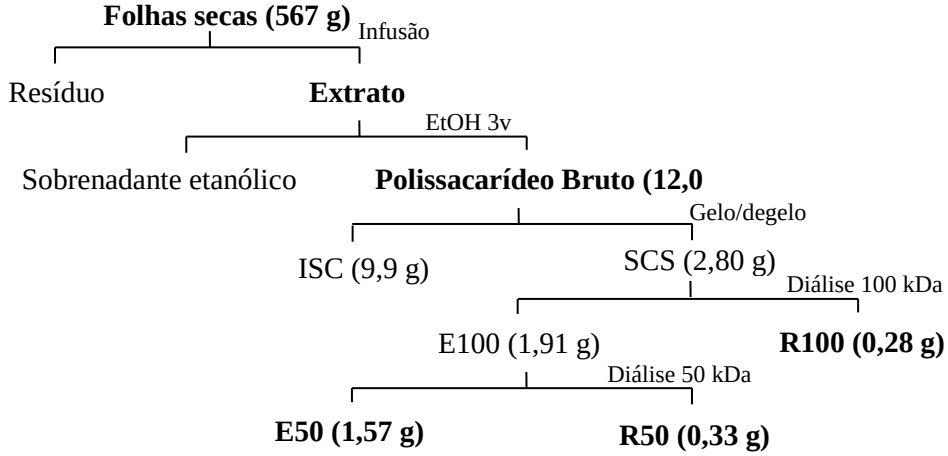


Figura. 1. Fluxograma do processo de obtenção de polissacarídeos a partir do infuso das folhas de *C. sylvestris*.

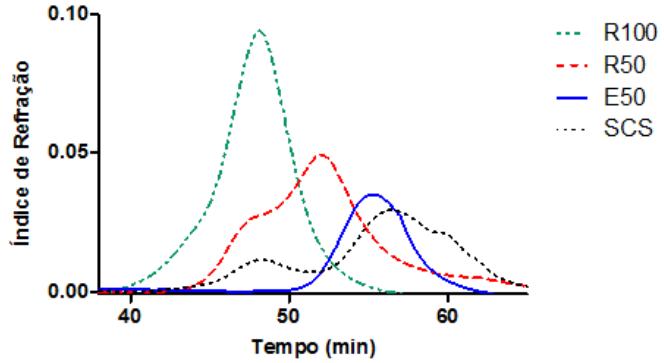


Figura. 2. Perfil de eluição das frações SCS, E50, R50 e R100 de *C. sylvestris* em HPSEC.

A fração R100 apresentou M_w de 356,800 g/mol (*dn*/*dc* = 0.129), e arabinose, galactose, ácido galacturônico, glucose e ramnose em uma proporção molar de 19:17:6:4:1. A análise de metilação de R100 (Tabela 1) mostrou a presença de unidades Ara*f* 3-, 5-, 3,5- e 2,5- ligadas de acordo com a formação de acetatos de alditol de 2,5-Me_2-Ara (14,0%), 2,3-Me_2-Ara (14,8%) e 2-Me-Ara (1,8%), 3-Me-Ara (3,2%) respectivamente, sugerindo a presença de arabinana na fração. As arabinanas são polissacarídeos pécticos, com cadeia principal constituída por unidades de α-(1→5), e cadeias laterais formadas por arabinoses α-(1→3) e α-(l→2) ligadas (REID, 1997; CARPITA e GIBEAUT, 1993). Além disso, foram observadas unidades de Gal*p* 6-, 3,6- e 3,4,6-ligadas, como demonstrado pela presença de acetatos de alditol de 2,3,4-Me-Gal (7,0%), 2,4-Me_2-Gal (9,4%) e 2-Me-Gal (2,5%), sugerindo a presença de arabinogalactana do tipo II. Estas estruturas polissacarídicas são altamente ramificadas, possuem cadeia principal formada por (1→3) e/ou (1→6)-β-D-galactanas ligadas umas às outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6, e apresentam a maior parte das posições O-3 e O-6 restantes ocupadas por unidades de arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Foram também observados terminais não-redutores de Ara*f* (9,3%), Ara*p* (5,3%), Gal (8,3%) e Rha (2,6%) e Glc (1,4%). A presença de glucose α(1→4)-ligada (12,6%) também foi observada, sugerindo a presença de amido. Após a

carboxirredução de R100 observou-se o aumento do derivado 2,3,6-Me_3-Gal*p* de 2,69% para 13,27% indicando a presença de Gal*p*A 4-ligado.

Tabela 1. Perfil de alditóis acetatos parcialmente metilados e estruturas de monossacarídeos de R100.

O-Me-alditol acetato	**Ligação**	**Mol % R100**	
		Nativa	**Carboxirreduzida**
2,3,4-Me_3-Ara*f*	Ara*f*-(1→	5,36	1,54
2,3,5-Me_3-Araf	Ara*f*-(1→	9,41	3,88
2,5-Me_2-Ara*f*	→3)-Ara*f*-(1→	14,36	9,54
2,3-Me_2-Ara*f*	→5)-Ara*f*-(1→	14,87	7,87
2-Me-Ara*f*	→3,5)-Ara*f*-(1→	1,82	2,45
3-Me-Ara*f*	→2,5)-Ara*f*-(1→	3,22	4,63
3,4-Me_2-Rha*p*	→2)-Rha*p*-(1→	5,41	1,87
3-Me-Rha*p*	→2,4)-Rha*p*-(1→	-	1,79
2,3,4-Me_3-Rha*p*	Rha*p*-(1→	3,61	Tr
2,3,4,6-Me_4-Glc*p*	Glc*p*-(1→	1,38	5,80
2,3,6-Me_3-Glc*p*	Gal*p*-(1→	8,37	5,96
2,3,6-Me_3-Gal*p*	→4)-Gal*p*-(1→	2,69	13,27
2,3,6-Me_3-Gal*p*	→4)-Glc*p*-(1→	11,97	15,93
2,3,4-Me_3-Gal*p*	→6)-Gal*p*-(1→	6,93	10,47
2,4-Me_2-Gal*p*	→3,6)-Gal*p*-(1→	9,31	13,16
2-Me-Gal*p*	→3,4,6)-Gal*p*-(1→	1,29	1,38

O $^{13}C/^{1}H$-HSQC-DEPT de R100 (Fig. 3) apresentou correlações em δ 103,3/4,50 (C-1/H-1), 71,6/3,42 (C-2/H-2), 76.7/3.94 (C-3/H-3) 74,7/3,69 (C-5/H-5), e 69,4/4,06 (C-6/H-6 substituído), típicos de unidades de →3,6)-β-D-Galp-(1→ presentes em arabinogalactanas do tipo II (DELGOBO et al., 1998, 1999; RENARD et al., 1997).

Ainda, no espectro de HSQC de R100 foi possível observar a presença de correlações típicas de C-1/H-1 de α-L-Ara*f*, em 107,8/5,57, 107,08/5,20, 107,3/5,07 e terminal não-redutor em 109,0/5,23, além de sinal de Ara*p* em 101,1/5,09. As correlações em 99,4/5,00 e 79,8/3,70 foram de C-1/H-1 e C-4/H-4 de α-D-Glc*p*, evidenciando a presença de amido (DELGOBO et al., 1998, 1999; RENARD et al., 1997; ODONMAIIG et al., 1994).

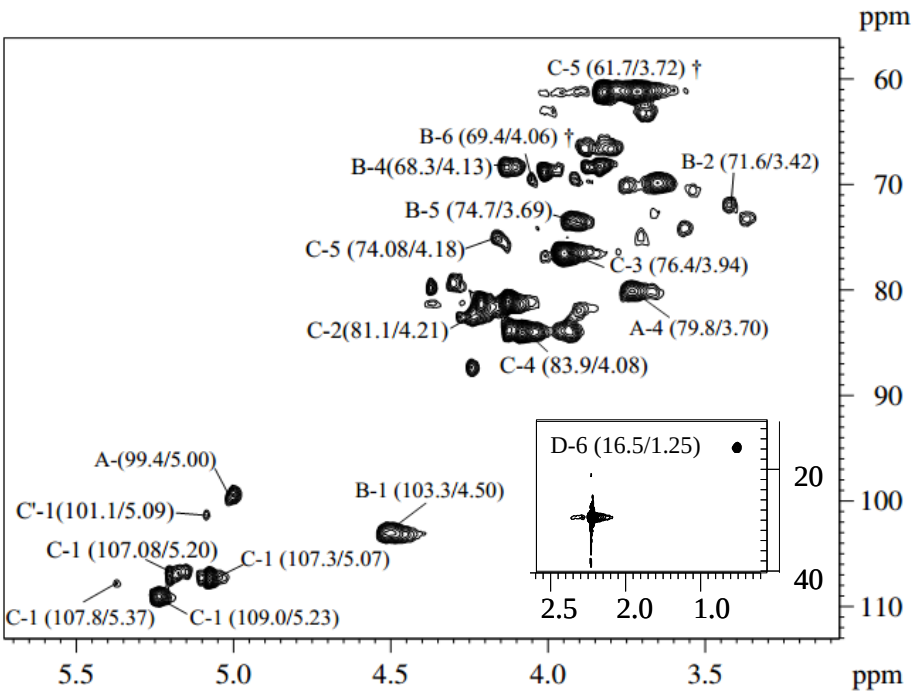


Figura. 3. Mapa de corelaçao de $^{13}C/^{1}H$-HSQC-DEPT de R100. Solvente D_2O, a 70 °C. Os valores numéricos estão em δ ppm. A (α-D-Glc*p*), B (β-D-Gal*p*), C, C' (α-L-Ara*f*), D (α-L-Rha*p*). As letras são seguidas pelo número dos átomos de carbono das unidades monossacarídicas. † Sinais invertidos representando C-6/H-6 e C-5/H-5.

A análise de $^{13}C/^{1}H$-HSQC-DEPT, juntamente com os dados obtidos por metilação, demonstram que a fração R100 é uma fração péctica constituída, provavelmente, por uma mistura de arabinana, arabinogalactana do tipo II, ramnogalacturonana tipo I e amido.

4.4.2 Sedum dendroideum

Polissacarídeos foram obtidos a partir da infusão das folhas secas (1,25 kg) de *S. dendroideum* (Fig. 4). O infuso foi tratado com etanol (3 volumes), gerando um precipitando (PSC; 11,3 g) contendo os polissacarídeos brutos. Estes foram fracionados por congelamento e descongelamento, gerando a fração sobrenadante solúvel em água fria (SBAL; 4,1 g), a qual foi submetida a diálise em membrana com limite de exclusão de 100 kDa, gerando duas frações identificadas como RSBAL (2,55 g) e ESBAL (1,54 g). Ambas as frações apresentaram perfil homogêneo de eluição em HPSEC (Fig. 5).

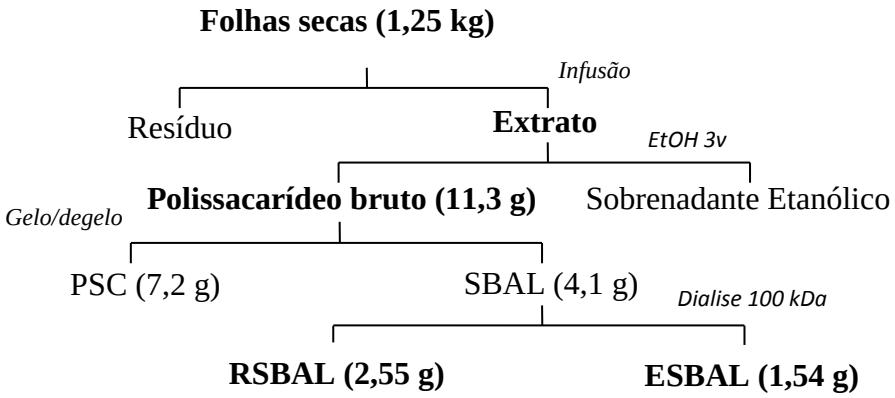
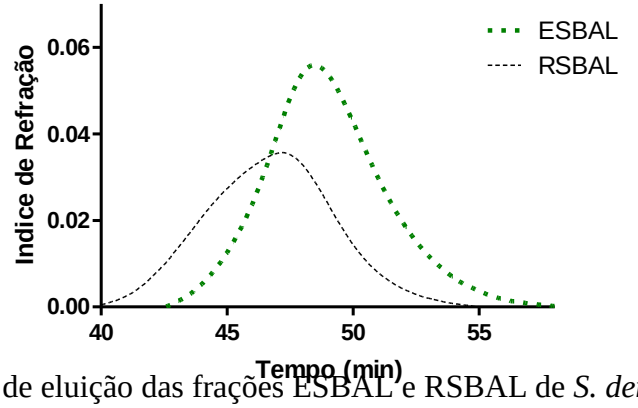


Figura. 4. Fluxograma do processo de obtenção de polissacarídeos a partir do infuso das folhas de *S. dendroideum*.



igura. 5. Perfil de eluição das frações ESBAL e RSBAL de *S. dendroideum* em HPSEC.

A fração ESBAL apresentou M_w de 88,870 g/mol (*dn*/*dc* = 0,129) e ácido galacturônico (identificado por TLC), galactose, arabinose, ramnose e glucose em uma proporção molar de 36:10:9:1:1. A análise de metilação de ESBAL (Tabela 2) mostrou a presença de unidades de Gal*p* 6-, 3,6- e 3,4,6-ligadas, nas proporções de 9,4%, 17,8% e 11,3% respectivamente. Mostrou também unidades de Ara*f* 3-, 5-ligadas, nas proporções de 3,6% e 10,7%, respectivamente, unidades de Rha*p* 2,4-ligadas (1,5%) e terminais não-redutores de Ara*f* (40,2%), Gal*p* (5,4%). Na análise de metilação de ESBAL-CR (carboxirreduzido) destaca-se a presença de Gal*p*A 4-ligado (65,5%).

Tabela 2. Perfil de alditóis acetatos parcialmente metilados e estruturas de monossacarídeos de ESBAL.

		Mol %	
O-Me-alditol acetato	**Ligações**	**Nativo**	**Carboxirreduzido**
2,3,4-Me_3-Ara*f*	Ara*f*-(1→	40,2	12,6
2,5-Me_2-Ara*f*	→3)-Ara*f*–(1→	3,6	-
2,3-Me_2-Ara*f*	→5)-Ara*f*–(1→	10,7	-
2-Me_3-Ara*f*	→3,5)-Ara*f*–(1→	-	2,4
3-Me-Rha*p*	→2,4)-Rha*p*–(1→	1,5	-
2,3,4,6-Me_4-Gal*p*	Gal*p*-(1→	5,4	8,8
2,3,6-Me_3-Gal*p*	→4)-Gal*p*A-(1→	-	65,5
2,4,6-Me_3-Gal*p*	→6)-Gal*p*-(1→	9,4	-
2,4-Me_2-Gal*p*	→3,6)-Gal*p*-(1→	17,8	3,1
2-Me_2-Gal*p*	→3,4,6)-Gal*p*-(1→	11,3	7,5

O $^{13}C/^{1}H$-HSQC-DEPT de ESBAL (Fig. 6) apresentou correlações em δ 99.8/4.93 (C-1/H-1), 70.4/5,09 (C-5/H-5), 78.6/4.43 (C-4/H-4) e 52.8/3.81 (-O-$\underline{CH_3}$) de unidades de 6-OMe-D-Gal*p*A (1→4)-ligadas. As correlações em δ 99.0/5.12 (C-1/H-1), 71.3/4.65

(C-5/H-5) e 78.6/4.43 (C-4/H-4) de unidades de D-Gal*p*A (1→4)-ligadas (NASCIMENTO et al., 2013; POPOV et al., 2011; CARLOTTO et al., 2016). Além disso, foi observada correlação $^{13}C/^{1}H$ de CH_3 de grupo acetil em δ 20.3/2.09 (NASCIMENTO et al., 2013, CARLOTTO et al., 2016). As correlações de $^{13}C/^{1}H$ das unidades de β-D-Gal*p* apareceram em δ 103.2/4.50 (C-1/H-1), 80.1/3.71 (C-3/H-3 substituído), 69.4/4.06 (C-6/H-6 substituído) (DELGOBO et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2013; CARLOTTO et al, 2016). De acordo com a integração das intensidades das correlações de C-5/H-5 em HSQC, de unidades de 6-OMe-D-Gal*p*A e D-Gal*p*A, o grau de metil-esterificação foi de 63%. A correlação de C-6/H-6 das unidades de α-L-Rha*p* apareceu em δ 17.1/1.20 (RENARD et al., 1997). ESBAL também mostrou correlações de C-1/H-1 de unidades de α-L-Ara*f* em δ 108.1/5.42 e 108.9/5.25 e de C-2/H-2, C-4/H-4 e C-5/ H-5 em δ 81.2/4.21, 84.0/4.09, 61.3/3.78, respectivamente (DELGOBO, 1998).

Unidades de ácido galacturônico (1→4)-ligadas estão, normalmente, presentes em homogalacturonanas (RENARD et al., 1997; CARPITA e GIBEAU, 1993; POPOV et al., 2011), que representa o polissacarídeo majoritário da fração ESBAL. Enquanto a presença das unidades de Gal 6- e 3,6-ligadas e Ara 3- e 5-ligadas indicam a presença de arabinogalactana do tipo II e arabinanas na fração ESBAL (MOHNEN, 2008).

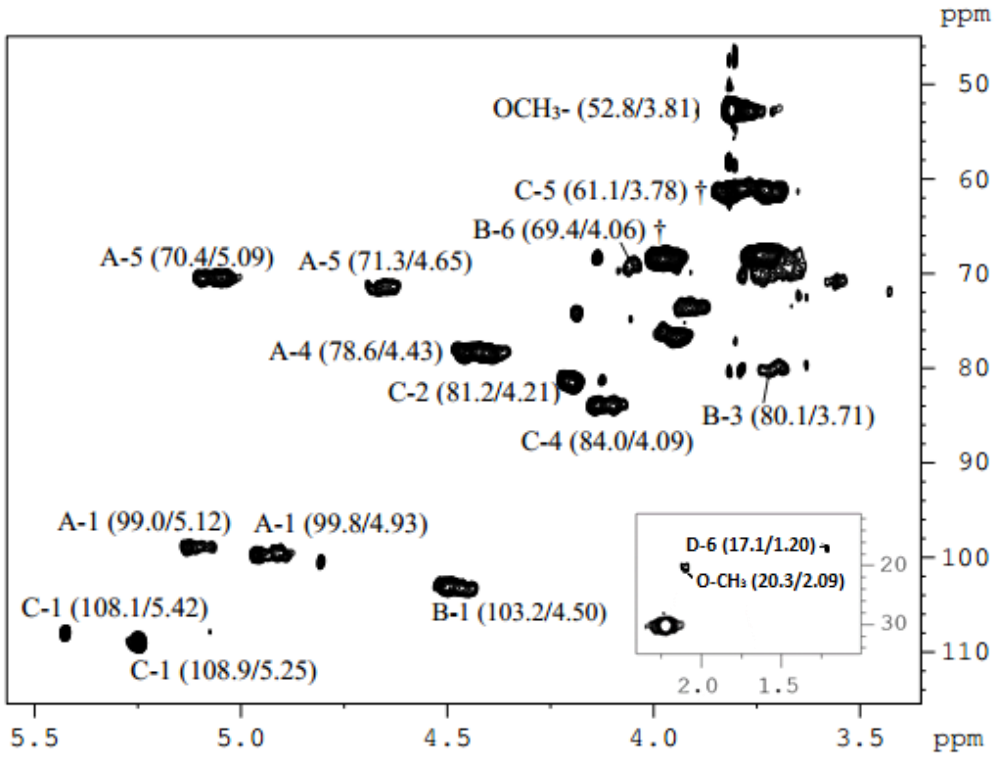


Figura. 6. $^{1}H/^{13}C$ Mapa de corelaçao de $^{13}C/^{1}H$-HSQC-DEPT de ESBAL. Solvente D_2O, a 70 °C; Os valores numéricos estão em δ ppm. A, (6-OMe-α-D-Glc*p*A), B (β-D-Gal*p*), C, (α-L-Ara*f*). As letras são seguidas pelo número dos átomos de carbono das unidades monossacarídicas. † Sinais invertidos representando C-6/H-5 e C-6/H-6.

5. CONCLUSÕES

- O infuso de *S. dendroideum* proporcionou uma fração polissacarídica (RSBAL) constituída por uma homogalacturonana ligada à estruturas neutras de arabinanas e arabinogalactana de tipo II, a qual apresenta atividade gastroprotetora nas doses de 0,35, 0,70 e 1,4 mg/kg, preservandoo muco gástrico e os níveis de GSH.
- A fração polissacarídica do infuso de *S. dendroideum* (RSBAL) foi fracionada, obtendo-se, separadamente, uma homogalacturonana e uma homogalacturonana ramificada em O-3 por cadeias de arabinogalactana do tipo II e arabinana. Ambas são altamente metil-esterificadas, e influenciam secreção de citocinas pró- (TNF-α, IL-1β) e anti-inflamatórias (IL-10) de uma maneira dose- dependente. Na presença de LPS, as frações reduziram os níveis de secreção de TNF-α e IL-1β, e reduziram as razões TNF-α/IL-10 e IL-1β/IL-10, demonstrando um efeito anti-inflamatório desses polissacarídeos.
- Foi caracterizada uma quarta fração polissacarídica (ESBAL), do infuso de *S. dendroideum*, também constituída por homogalacturonana, arabinogalactana do tipo II e arabinana.
- Os polissacarídeos isolados do infuso das folhas de *C. sylvestris* mostraram atividade gastroprotetora. A administração oral da fração polissacarídica bruta, reduziu significativamente ulceração gástrica aguda induzida por etanol, nas doses de 0,003, 0,03 e 0,3 mg/kg.
- A fração E50, composta por arabinogalactana do tipo II e arabinanas, apresentou atividade gastroprotetora quando administrada oralmente, na dose de 0,03 mg/kg, evitando a formação de úlceras induzidas por etanol. Do mesmo modo, a administração intraperitoneal de E50, na dose de 0,003 mg/kg reduziu significativamente a formação de lesões gástricas induzidas pelo etanol em 84%. Além disso, administração oral diária de

E50 nas doses de 0,003, 0,03 e 0,3 mg/kg também promoveu a cicatrização de úlceras crônicas induzidas por ácido acético.

- O infuso de *C. sylvestris* também foi caracterizada outra fração (R100), constituída por uma mistura de arabinana, arabinogalactana do tipo II, ramnogalacturonana tipo I e amido.

REFERÊNCIAS

ALBANO, M.N.; Da SILVEIRA, M.R.; DANIELSKI, L.G.; FLORENTINO, D.; PETRONILHO, F.; PIOVEZAN, A.P. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v.147, n.3 p. 612-7, 2013.

ALMEIDA, A. **Atividades anti-inflamatória e antitumoral do extrato hidroalcóolico de *Casearia sylvestris***: estudo comparativo com os anti-inflamatórios piroxicam e meloxicam. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

ALVES, J.O.; MEMEDEIROS, J.A.P.; CATELLI, M.F.; Avaliação da Ação Cicatrizante da Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.) em Feridas Experimentalmente Induzidas em Camundongos. **Nucleus Animalium**, v.8, n1, 2016.

AMENI, A. Z. **Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris*: constituintes químicos, potencial terapêutico e interações medicamentosas**. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2015.

ARANTES, A. B. **Desenvolvimento de Dentifrícios com Extratos Fluidos De *Calendula Officinalis* L.; (Asteraceae) e *Casearia Sylvestris* Sw.; (Flacourtiaceae), Destinado ao Tratamento de Periodontias**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

ARAÚJO, E.J.F.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUSA, L.Q.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J.; TOME, A.R.; PERON, A.P.; SANTOS, A.G.; CITO, A.M.G.L.; PESSOA, C.; FREITAS, R.M.; FERREIRA, P.M.P. Counteracting effects on free radicals and

histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais Academia Brasileira de Ciências**. v. 87, n.3, p. 1797-1807, 2015.

ASPINAL, G. O. In: Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. New York: Academic Press, p. 95-115,1973.

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

BARDDAL, H.P.O.; GRACHER, A.H.P.; SIMAS-TOSIN, F.F.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R. Anticoagulant activity of native and partially degraded glycoglucuronomannan after chemical sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 80, p. 328-333, 2015.

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n.2, p.185-197, 1990.

BENSOUICI, C.A.; KABOUCHE, A.; KARIOTI, A.B.; ÖZTÜRK, M.C.; DURU, M.E.C.; BILIA, A.R.B.; KABOUCHE, Z. Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. **Pharmaceutical Biology**. v. 54, n.1, p. 174-179, 2016.

BENTO, T. S. **Atividade antifúngica de extrato de *Casearia sylvestris* Swartz e *Casearia decandra* Jacq e seus efeitos sobre o metabolismo enzimático de três espécies de basidiomicetos deterioradores de madeira**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de botânica da Secretaria de Meio Ambiente. São Paulo-SP, 2013.

BEZERRA, I.L. **Caracterização estrutural e estudo do potencial anti-inflamatório de polissacarídeos extraídos dos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Ssauvignon e Sauvignon Blanc**. 110 f. (Dissertação – Mestrado em Ciências Bioquímicas) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular- Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2016.

BORGES, M. H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V. M.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R..; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aquoseos extract of *Casearia sylvestris* (flacourtiaceae) on actions of snakes and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 127, n.1, p. 21-30, 2000.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSHESCHI, A.M.; RUCAVALO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of protease from bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v.39, n.12, p.1863-1869, 2001.

BOU, D.D.; LAGO, J.H.; FIGUEIREDO, C.R.; MATSUO, A.L.; GUANDAGNIN, R.C.; SOARES, M.G.; SARTORELLI, P. Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound α-zingiberene and derivatives. **Molecules**, v. 18, n.8, p. 9477–9487, 2013.

BRANT, N.M.F.; GASPAROTTO, F.M.; ARAÚJO, V.O.; MARASCHIN, J.C.; RIBEIRO, R.C.; LOURENÇO, B.; JUNIOR, C.; JUNIOR, A.G. Cardiovascular protective effects of *Casearia sylvestris* Swartz in Swiss and C57BL/6 LDLr-null mice undergoing high fat diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n.2, p 419-427, 2014.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Black & Chapman, Unwin Hyman, 194p. 1990.

BÜCKER, N.C.F. **Efeito Antitumoral e Antiangiogênico dos Extratos Bruto e Supercrítico de *Bidens Pilosa Linné* E *Casearia Sylvestris Swartz*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Programa de Pós-Graduação em Farmácia-Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis 2012.

BUENO, P.C.P.; PASSARELI, F.; ANHESINEA, B.N.; TORRES, R.B.; CAVALHEIRO, A.J. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 68, p. 23–26, 2016.

CAMARGO, F.G.; GOMES, E.; PANNUNZIO, E.; BUENO, V.S. Uso de extrato fluido de guaçatonga (*C. sylvestris*) topicamente em lesões de estomatite herpética. **Lecta-USF**, v. 11, n.1, p. 121-127, 1993.

CAMARGO, F.G.; PEREIRA, J.A.; BUENO, V.S.; GOMES, E.; ANDO, T. Ação do extrato alcoólico de guaçatonga diluído e tamponado em subcutâneo de camundongo: Parte II: estudo histológico. **Lecta –USF,** v.14, n.12, p. 61-86, 1996.

CAMARGO, M.E.M.; ROMERO, M.B.; ZAMORA, D.R.; CARRILLO, P.C.; MALDONADO, M.E.V. Study of the anti-inflammatory effect of *Sedum praealtum* (siempreviva) in the rat: dose dependent response. **Proceedings Western Pharmacology Society.** v. 45, p. 129- 130, 2002.

CAMPOS, E.P.; TROMBINI, L.N.; RODRIGUES, R.; PORTELLA, D.L.; WERNER, A.C.; FERRAZ, M.C.; De OLIVEIRA, R.V.; COGO, J.C.; OSHIMA-FRANCO, Y.; ARANHA, N.; GERENUTTI, M. Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second degree scald burns in rodents. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 269, 2015.

CANTU-JUNGLES, T. M.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Polysaccharides from

prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food Chemistry**, v. 146, p. 492-499, 2014.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, n.3, p. 531-537, 2008.

CARLOTTO, J., DE SOUZA, L. M., BAGGIO, C. H., WERNER, M. F. D. P., MARIA-FERREIRA, D., SASSAKI, G. L., CIPRIANI, T. R. Polysaccharides from *Arctium lappa* L.: Chemical structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 954-960, 2016.

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

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

CARRASCO, V. **Eficácia do extrato da folha do bálsamo *Sedum dendroideum* na prevenção e no tratamento da úlcera gástrica induzida em animais**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados- MS, 2014.

CAVALCANTE, W.L.G; CAMPOS, T.O; PAI-SILVA, M.D; PEREIRA, P.S; OLIVEIRA, C.Z; SOARES, A.M; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in

mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n.3, p. 490-497, 2007.

CAVALHEIRO, A.H.; GODOI, A.P.T.; CARVALHO, T.C; CATIRSE, A.B.; FURTADO, N.A.J.C. Antimicrobial potential of *Casearia sylvestris* against oral bacteria. **Revista de odontologia da UNESP**, v. 45, n.4, p. 214-218, 2016.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M.G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; LEITE, G.B.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Antibothropic action of Casearia sylvestris Sw. (Flacourtiaceae) extracts. Phytother Res. v. 22, n.6, p. 784-790, 2008.

CIPRIANI, T.R.; MELLINGER, C.G.; SOUZA, L.M.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARQUES, M.C.; GORIN, P.A.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M. A Polysaccharide from a Tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* Leaves with Anti-ulcer Protective Effects **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 7, p. 1018–1021, 2006.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. 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.; BERTOLINI, M.L.C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARQUES, M.C.A.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, p. 687-690, 2009a.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, M. L. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v.115, n. 2, p. 687-690, 2009b.

CIUCANU, I.; KEREK, F.A, 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, n.4, p. 937-944, 2012.

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

CURY, V.G.C. **Eficácia terapêutica da *Casearia sylvestris* sobre herpes labial e perspectiva de uso em saúde coletiva**. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba-SP, 2005.

Da SILVA, S.L, CHAAR, J.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Facourtiaceae). **European Journal of Pharmacology** v. 608, p. 76-83, 2009.

Da SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; Marangoni, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA (2) activity. **Toxicon**, v. 52, n.6, p. 655-666, 2008b.

Da SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; DAMICO, D.C.S.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**; v. 46, n.5, pp. 347–351, 2008a.

De MELO, G.O.; MALVAR, D.C.; VANDERLINDE, F.; PIRES, P.A.; CÔRTES, W.S.; FILHO, P.G.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S.; MATOS, L.G, KAISER, C.R. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, n.2, p. 228-232, 2009.

De MELO, G.O.; MALVAR, D.C.; VANDERLINDE, F.; PIRES, P.A.; CÔRTES, W.S.; FILHO, P.G.; MUZITANO, M.F.; KAISER, C.R.; COSTA, S.S. Phytochemical and pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice. **Jounal of ethnopharmacology**. v. 102, n.2, p. 217-220, 2005.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina.* **Phytochemistry**, v. 47, n.7, p. 1207-1214, 1998.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadanthera colubrina*) gum exudates:an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate.Research**, Amsterdam, v. 320, n.4, p. 167-175, 1999.

DINIZ, A. B.; ASTARITA, L.V.; SANTAREM, E.R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. Aspects of Medicine. Special Edition. **Elsevier Publications**, v. 21, n.2, p. 442-450, 2006.

Dos SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; PEREZ, C.C.; GOMES, T.A.; SILVA, G.H, BOLZANI, S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.D.O.; CAVALHEIRO AJ. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry Biodivers**, v.7, n.1, p. 205-215, 2010.

DUARTE, M.R.; ZANETI, C.C.; Morfoanatomia de folhas de bálsamo: *Sedum dendroideum* Moc. et Sessé ex DC, Crassulaceae. **Revista Lecta**. v. 20, n.2, p. 153-160, 2002.

EICHLER, A. G. Bixaceae. In: MARTIUS, C. F. P. Flora Brasiliensis, v. 1, p. 421-488, 1871.

EPAGRI − Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A, 1998. CD. Plantas Medicinais, versão 1.0, 12-15.

ESPINDOLA, L.S.; VASCONCELOS, J.J.R.; de MESQUITA, M.L.; MARQUIE, P.; de PAULA, J.E.; MAMBU, L.; SANTANA, J.M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. **Planta Med**ica, v.70, n.11, p. 1093-1095, 2004.

ESPINOSA, J.; MEDEIROS, L.; SOUZA, A.; GUNTZEL, A.; RUCKER, B.; CASALI, A.E.; ETHUR, E.M.; WINK, M.R.; TORRES, I. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* Sw exhibits in vitro antioxidant and antimicrobial activities and in vivo hypolipidemic effect in rats. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**. v.17, n.2, p. 305–315, 2015.

ESTEVES, I.; LIMA, M.L.; SILVA, M.L.; SANTOS, L.S.; RODRIGUES, M.; SILVA, J.M.S.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T. *Casearia sylvestris* Sw essential oil activity in inflammation in rats induced *By Bothrops alternatus* venom. International **Jounal of Pharmaceuticalogy**. v. 7, n.2, p. 28–32, 2011.

ESTEVES, I.; SOUZA, I.R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.G.V.; SANTOS, L.S.; SERTIE, J.A.A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L.M.; SCHNNEDORF, J.M.; BASTOS, J.K.; CRAVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, n.3, p. 191-196, 2005.

FELIPE, K.B. **Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris***. 97 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

FELIPE, K.B.; KVIECINSKI, M.R.; DA SILVA, F.O.; BÜCKER, N.F.; FARIAS, M.S.; CASTRO, L.S.; GRINEVICIUS, V.M.; MOTTA, N.S.; CORREIA, J.F.; ROSSI, M.H.; PEDROSA, R.C. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Jounal of Ethnopharmacolology,** v. 29, n.3, p. 1492-1499, 2014.

FERREIRA, P.M.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.; Barros F.W.A.; Martins, A.; Cavalheiro, J.A.; Bolzani, V.S.; Santos, A.G.; Pessoa, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, v.8, n.4, p.1373-1384, 2011.

FERREIRA, P.M.P. **Determinação do Potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris Swartz***. 105f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) -Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FERREIRA, P.M.P.; BEZERRA, D.P.; SILVA, J.N.; COSTA, M.P.; FERREIRA, J.R.O.; ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, I.S.T.; CAVALHEIRO, A.J.; MACHADO,

C.M.L.; CHAMMAS, R.; ALVES, A.P.N.N.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. **Jounal of Ethnopharmacology**. v. 186, p. 270–279, 2016.

FERREIRA, P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n.3, p. 497–504, 2010.

FIALHO, S.S.; NOGUEIRA, G.M.; DUARTE, C.A.; PAIVA, A.O.; MACORIS, D.G. *Casearia sylvestri*s na permeabilidade gástrica à sacarose em equinos submetidos a protocolo de indução de úlcera gástrica. **Ciência Rural** vol.40, n.2, p. 348-355, 2010.

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

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

FREYSDOTTIR, J.; LOGADOTTIR, O.T.; OMARSDOTTIR, S.S.; VIKINGSSON, A.; HARDARDOTTIR, I. A polysaccharide fraction from *Achillea millefolium* increases cytokine secretion and reduces activation of Akt, ERK and NF-B in THP-1 monocytes. **Carbohydrate Polymers**. v. 143, n.5, p. 131–138, 2016.

GAN, L.; ZHANG, S. H.; YANG, X. L.; XU, H. B. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 4, p. 563-569, 2004.

GARCÍA-PINEDA, J.; WENS, M.A.; VALENCIA, A.; GALLEGOS, A.J.; Acción de *Sedum dendroideum* sobre la actividad funcional de los espermatozoides. **Archivos de Investigación Médica**. v. 17, n.4, p. 391–397, 1986.

GASPI, F.O.G.; TANAKA, E.E.; CAPELLARI, J.R.; MONTEIRO, K.M.; CARVALHO, J. E. Ethnopharmacological Study of Antiulcerogenic Activity of *Sedum dendroideum* Moc. et Sessé ex DC. (Crassulaceae). In: 15th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology, Petra. abstract book of the 15th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology, v. 1. p. 120-120, 2015.

GHAOUI, W.B.; GHANEM, E.B.; CHEDID, L.A.; ABDELNOOR, A.M. The effects of Alcea rosea L.; *Malva sylvestris* L. and *Salvia libanotica* L. water extracts on the production of anti-egg albumin antibodies, interleukin-4, gamma interferon and interleukin-12 in BALB/c mice. **Phytotherapy Research**. v.22, n.12, p.1599-604, 2008.

GODOI, A.P.T. **Estudo do Óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da Formulação de Enxaguatório bucal**. Caracterização química, Citotoxidade, Potencial antimicrobiano e Efeito nas propriedades dos Materiais Odontológicos estéticos. 210 f.Tese (Doutorado em reabilitação oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade Estadual Paulista, Ribeirão Preto, 2013.

GORIN, P. A. J; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, n.142, p. 119-132, 1984.

GRANDI, T. S. M. Tratado das plantas medicinais mineiras, nativas e cultivadas. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 1204p, 2014.

GUIL-GUERRERO, J.; CAMPRA, P. Cytotoxicity screening of endemic plants from Guayana highlands. **Tropical Biomedicine**. v. 26, n.2, p. 149-54, 2009.

GÜNTZEL, A.R.C. **Avaliação das atividades farmacológicas de *Casearia sylvestris* Sw.** Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) - Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2008.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumour activity. **Phytotherapy Research**, v.13, n.5, p. 380-387,1999.

HU, Q. P.; XU, J. G. Active Components and Antimicrobial Activity in two Sedum Species Grown in Shanxi Huoshan, China. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 10, n. 2, p. 172-174, 2012.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL E.P.; MOTIDOME. M. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmacology Bulletin,** v. 38, n.12, p. 3384-8, 1990.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy**. Chemical and Pharmacology Bulletin** v. 36, n.4, p. 1585-1588, 1988.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LNNGREN, J**. A pratical guide to the methylation analysis of carbohydrate**s. Editors Univ., p. 1-70, 1976.

KOUAKOU, K.; SCHEPETKIN, I.A.; YAPI, A.; KIRPOTINA, L.N.; JUTILA, M.A.; QUINN, M.T. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Alchornea cordifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n.1, p. 232–242, 2013.

LAGES, C.C.L. **Avaliação do potencial antitumoral da espécie *Casearia sylvestris*.** Dissertação (Mestrado em Química). 74 f. Departamento de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

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

LENZI, R.M.; CAMPESTRINIA, L.H.; OKUMURAA, L.M.; BERTOL, G.; KAISERC, S.; ORTEGAC, G.G.; GOMESE, E.M.; BOVOD, F.; ZAWADZKI-BAGGIOA, S.F.; STEVAN-HANCKEF, F.R.; MAURER, J.B.B. Effects of aqueous fractions of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. on macrophage modulatory activities. **Food Research International**, v.53, n.2, p.767-779, 2013.

LIMA, M.P. **Influência dos extratos de *Casearia sylvestris, Bauhinia microstachya, Rauvolfia sellowii* e *Himatanthus lancifolius* sobre o comportamento de células HL-60, K-562, DAUDI e REH**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal deo Paraná, Curitiba, 2008.

LOPES, P. C.; KIRITANI, C.; TEODORO, G.R.; PEREIRA, D.F.A.; BRIGHENTI, F.L.; KOGA-ITO, C.Y. Avaliação da atividade antifúngica de um creme a base *de Casearia sylvestris Swart* (Guaçatonga) sobre cepas de *Candida albicans* previamente isoladas da cavidade bucal. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 1a. fase, São José dos Campos. XXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2010.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras** – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas e Árvores Nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v.1 2002. – 4ª Edição. p.1120.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. Ed.; São Paulo:Ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001, 476p.

MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.C.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, v.18, n.3, p. 337–342, 2004.

MALVAR, D.C.; PIRES, P. A.; de MELO, G.O.; COSTA, S.S.; GERMANO FILHO, P.; CÔRTES, W.S.; VANDERLINDE, F.A. Influência do pré-tratamento com o sumo do *Sedum dendroideum* (Bálsamo) Sobre a Nocicepção de Camundongos (Mus musculus). **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida**. v. 24, n.2, p. 135-140, 2004.

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, H. Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilexparaguariensis* A. St.-Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p.125-133, 2013.

MARQUES, F.A. **Investigação do potencial antimicrobiano de *Casearia sylvestris* sobre microrganismo endossimbionte de *Diabrotica speciosa***. 173 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

MARQUES, M.B. **Triagem fitoquímica e avaliação da sensibilidade antimicrobiana e da genotoxicidade de *Sedum praealtum* DC. (Bálsamo).** 57 f. Dissertação (Mestrado

em Ciência Animal) - Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas-MG, 2015.

MATSUMOTO, T.; MORIGUCHI, R.; YAMADA, H. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by hydrochloric acid/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, n.6, p. 535-539, 1993.

MATTOS, E.S.; FREDERICO, M.J.S.; COLLE, T.D.; de PIERI, D.V.; PETERS, R.R.; PIOVEZAN A.P. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**. v.112, n. 1, p. 1-6, 2007.

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

MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n.1, p. 165-170, 2007.

MESQUITA, M.L; DE PAULA, J.E; PESSOA C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; GROUGNET, R.; MICHEL S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L.S.

Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, n.3, p. 439-445, 2009.

MILANEZE, M. A.; GONÇALVES, E. Caracterização morfo-anatômica das folhas de *Sedum Dendroideum* DC, Crassulaceae In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 3.; 2001, Curitiba. Anais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Laboratório de Farmacognosia, 2001.

MILANI, S.; CALABRO, A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microscopy Research Technique**, v. 53, n.5, p. 360-371, 2001.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n.3, p. 266-277, 2008.

MORITA, H.; M. NAKAYAMA, H. KOJIMA, K. TAKEYA, H. ITOKAWA, E.P. SCHENKEL E M. MOTIDOME. 1991. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n.3, p. 693-7, 1991.

MULINACCI, N.; VINCIERI, F.F.; BALDI, A.; BAMBAGIOTTI-ALBERTI, M.; SENDL, A. WAGNER, H. Flavonol Glycosides from *Sedum telephium* Subspecies Maximum Leaves. **Phytochemistry**. v. 38, n.3, p. 531-533, 1995.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n.1, p. 37-41, 2005.

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**, v. 85, p. 137-142, 2013.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 255-269, 2005.

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

NIEMANN, G. J.; VISSER-SIMONS, J. M. J.; HART, H. Flavonoids of some species of Sedum. **Planta Medica**, v. 30, n.4, p. 384–387, 1976.

OBERLIES, N.H.; BURGESS, J.P.; NAVARRO, H.A.; PINOS, R.E.; FAIRCHILD, C.R.; PETERSON, R.W.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; WANI M.C.; WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Produts**, v. 65, n.2, p. 95-9, 2002.

OCHOA, T.R.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G.L.; CIPRIANI. T.R. Sulfation of fucogalactan from Agaricus bisporus: Different patterns in the chemical structure and their effects on anticoagulant. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 357-364, 2017.

ODONMAIIG, P., EBRINGEROVA, A. MACHOVA, E., ALFIJLDI, J. Structural and molecular properties of the arabinogalactan isolated from Mongolian larchwood (*Larix dahurica* L.) **Carbohydrate Research**, v. 252 p. 317-324, 1994.

OSHIMA-FRANCO, Y.; ALVES, C. M. V.; ANDRÉO FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C. O.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; SILVA, M. G. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-i, a myotoxin from Bothrops jararacussu snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 11, n.4, p. 465-478, 2005.

PASSARELI, F. Preparação e caracterização de casearinas de *Casearia sylvestris* como padrão fitoquímico. 183 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, Araraquuara-SP, 2010.

POPOV, S. V and OVODOV, Yu. S. Polypotency of the Immunomodulatory Effect of Pectins. **Biochemistry (Moscow),** v. 78, n.7, p. 823-835, 2013.

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G., GOLOVCHENKO, V. V., PUPOVA, G. Y., VIATYASEV, F. V., SHASHKOV, A. S., OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflamatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, v. 124, n.1, p. 309-315, 2011.

PRIETO, A.M.; Dos SANTOS, A.G.; OLIVEIRA, A.P.; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.; BOLZANI, V.S.; VARANDA, E.A.; SOARES, C.P. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food Chemistry of Toxicology**, v. 53, p. 153-159, 2013.

PRIETO, A.M.; SANTOS, A.G.; CSIPAK, A.R.; CALIRI, C.M.; SILVA, I.C.; ARBEX, M.A.; SILVA, F.S.; MARCHI, M.R.; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.; BOLZANI, V.S.; SOARES. C.P. Chemopreventive activity of compounds extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) Sw against DNA damage induced by particulate matter emitted by sugarcane burning near Araraquara, Brazil. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, n.3, p. 368–372, 2012.

RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; DUARTE, D.S.; BORGES, M.H.; LIMA, M.E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Boll Chemical Farmacology**, v. 14, n.6, p. 457-460, 2002.

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

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAULT, J. F. Isolation and structural characterization of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**. v. 305, n.2, p. 271-280, 1997.

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

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.

RODRIGUES, A.M.S.; de PAULA.; J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.E.; ESPINDOLA, LS. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against Aedes aegypti. **Jounal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n.2, p. 314-7, 2006.

RUPPELT, B.M.; PEREIRA, E.F.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A.; Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom-I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 86, pp. 203-205, 1991.

SÁ, IVONE, M. Levantamento Etnobotânico em Santo Antonio do Rio Grande, Sul de Minas, Brasil" 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

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

SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. Quimica Nova, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.P.; JÚNIOR, V.G.M; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.O; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry and Diversity**, v.7, n.1, p. 205-215, 2010.

SANTOS, A.G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico**. 335 f. Tese **(**Doutorado em Química) Instituto de Química**,** Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SANTOS, K.C. Estudos fitoquímicos e avaliação da atividade antitumoral de extratos vegetais de *Casearia sylvestris* nanoencapsulados. 188 f. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

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 M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (Ed), Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press: Boca Raton, USA, p. 255-276, 2008.

SASSIOTO, M.C.P.; FILHO, N.C.; FACCO, G.G.; SODRÉ, S.T.; NEVES, N.; PURISCO, S.U.; FARIAS, A.G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. Acta Cirurgica Brasileira**,** v.19, **n.6,** p. 637–641, 2004.

SCHEPETKIN, I.A.; FAULKNER, C.L.; NELSON-OVERTON, L.K.; WILEY, J.A.; QUINN, M.T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **International Immunopharmacology**. v.5, n.13, p.1783-1799, 2005.

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

SCHINDLER, T. M. The view of primary cell wall. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.161, n.5, p. 499-508, 1998.

SCHNEIDER, N. F. Z.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; FLACH, A. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Casearia sylvestris* Swart. Revista Brasileira de Farmacologia. v.87, **n.4 p.** 112-14, 2006.

SCHOENFELDER, T.; PICH, C.T.; GEREMIAS, R.; ÁVILA, S.; DAMINELLI, E.M.; PEDROSA, R.C.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. Fitoterapia. v.79, **n.6,** p. 465-467, 2008.

SENDL, A.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F.F.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Sedum telephium*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1357- 1362, 1993.

SERTIÉ, J.A.A.; CARVALHO, J.C.T.; PANIZZA, S. Antiulcer Activity of the Crude Extract from the Leaves of *Casearia sylvestris*. Pharmaceutical Biology, v. 38, **n. 2,** p. 112-119, 2000.

SILVA, F.B.; ALMEIDA, J.M.; SOUSA, S.M.G. Natural medicaments in endodontic-a comparative study of the anti-inflammatory action. Brazil Oral Research. v.18, **n.2,** p. 174-**179**, 2004.

SILVA, FA.; SILVA, E.S.; APOLINÁRIO, J.C.G.; BAISH, A.L.N.; ALAM, M.F.; OLIVERIA, B.T.; BATTASTINI, A.M.; TORRES, F.; RACOSKI G.; LAPA, A.J. Estudos farmacológicos Preliminares dos extratos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Vittale.** v. 2, p. 57 – 99. 1986.

SILVA, S.I.; FIGUEIREDO, P.M.S.; CHAAR, J.S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica.** v. 38, n.1, p. 107-112, 2008.

SILVA-TORRES, R.; MONTELLANO-ROSALES, H.; RAMOS-ZAMORA, D.; CASTRO-MUSSOT, M.E.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M. Spermicidal Activity of the Crude Ethanol Extract of *Sedum praealtum* in Mice. **Journal of Ethopharmacology**, v. 85, n.1, p. 15-17, 2003.

SIMÃO, A.A. Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade. 182 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Departamento de Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R**. Farmacognosia: da planta ao medicamento**. – 5 Edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SLEUMER, H. O. Flacourtiaceae: flora neotropica; monograph number 22. New York: **The New York Botanic Garden**. p.499, 1980.

SLOMP, L. **Prospecção de Extratos Etanólicos de Plantas Medicinais na Busca por Nematicidas**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

SOUSA, F.G.; SCHNEIDER, N.F.Z.; MENDES, C.E.; MOURA, N.F.; MENDES, C.E.; MOURA, N.F.; DENARDIN, R.B.N.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Clastogenic and Anticlastogenic Effect of the Essential Oil from *Casearia sylvestris* Swart. **Journal of Essential Oil Reseach**, v. 19, p. 376–378. 2007.

SOUZA, A.P.G.F. Efeito da *Casearia sylvestris* Sw (Guaçatonga) e do Laser In GAP nas diferentes fases do processo de cicatrização de feridas dérmicas. 125 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2010.

STEVENS, J.F.; HART, H.; ELEMA, E.T.; BOLCK, A. Flavonoid variation in Eurasian Sedum and Sempervivum. **Phytochemistry**, v. 41, n.2, p. 503-512, 1996.

TANAKA, L.Y.A.; De OLIVEIRA, A.J.B.; GONALVES, J.E.; CIPRIANI, T.R.; De SOUZA, L.M.; MARQUES, M.C.A.; De PAULA, M.F. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers.** v. 82, n.3, p. 714-721, 2010.

TAVARES, W.L.F.; APOLÔNIO, A.C.M.; GOMES, R.T.; TEIXEIRA, K.I.R..; BRANDÃO, M.G.L.; SANTOS, V.R.; Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.3, p. 257-260, 2008.

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

TORRES, R.B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de Casearia Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 239-258, 1986.

TROFIMOVA, N.; MEDVEDEVA,E.N.; IVANOVA, N.V.; MALKOV, Y.A.; ANATOLIEVICH BABKIN, V.A. Polysaccharides from Larch Biomass, The Complex World of Polysaccharides, Dr. Desiree Nedra Karunaratne (Ed.), InTech, DOI:

10.5772/53809. Disponível em: https://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/polysaccharides-from-larch-biomass.

VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plant cell wall architecture. **Cell**, v. 56, n.2, p. 231-239, 1989.

WECKWERTH, P.H.; SANTOS, F.; DUARTE, M.A.H.; VIVAN, R.R.; WECKWERTH, A.C.V.B. Comparação da atividade antimicrobiana in vitro de diferentes antibióticos e extratos hidroalcoólicos e infusão de *Casearia sylvestris* Swart (Guaçatonga) frente a linhagens de *Enterococcus faecalis* isolados da cavidade oral. **Salusvita**. v. 27, n.2, p. 259-74, 2008.

WERLE, A.L.B.; ZANETTI, G.D.; CERON, C.S.; MANFRO, M.P. Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.19, n.2, 2009.

WERNER, M.F, BAGGIO, C.H.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M. ASPINAL, G. O. In: Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. New York: **Academic Pressp**. 95-115, 1973.

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

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.

WOLBIŚ, M. Flavonol glycosides from *Sedum album*. **Phytochemistry**. v. 28, n.8, p. 2187-2189, 1989.

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

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

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

YAMADA, H.; OHTANI, K.; KIYOHARA, H.; CYONG, J.C.; OTSUKA, Y.; UENO, Y.; OMURA, S. Purification and chemical properties of anti-complementary polysaccharide from the leaves of *Artemisia princeps*. **Planta Medica**, Stuttgard: New York, v.51, n.2, p.121-125, 1985.

YAMASSAKI, F.T.; LENZI, R.M.; CAMPESTRINI, L.H.; BOVO, F.; SEYFRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.1.; STEVAN-HANCKE, F.R.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; PETTOLINO, F.A.; BACIC, A.; MAURER, J.B. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v.125, p. 241- 248, 2015.

YAPO, B. M. Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins – A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n.2, p. 373-385, 2011.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n.4, p. 1395- 1410, 2012.

ANEXO-1 RIGHTS OF INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES FOR USE THE ARTICLE I IN THE PRESENT THESIS

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Aug 17, 2017

This Agreement between Mrs. Ana Flávia Oliveira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4171300010623
License date	Aug 17, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	International Journal of Biological Macromolecules
Licensed Content Title	Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharides obtained from infusion of Sedum dendroideum leaves
Licensed Content Author	Ana Flávia de Oliveira,Geórgia Erdmann do Nascimento,Marcello Iacomini,Lucimara Mach Côrtes Cordeiro,Thales Ricardo Cipriani
Licensed Content Date	Available online 23 July 2017
Licensed Content Volume	n/a
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	1
Start Page	
End Page	
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	POLISSACARÍDEOS DAS PLANTAS Sedum dendroideum E Casearia sylvestris E SUAS ATIVIDADES IMUNOMODULADORA E ANTI-ULCERA GÁSTRICA
Expected completion date	Aug 2017
Estimated size (number of pages)	155
Requestor Location	Mrs. Ana Flávia Oliveira Evaristo F. F. da Costa Curitiba, Paraná 80050-540 Brazil Attn: Mrs. Ana Flávia Oliveira
Billing Type	Invoice
Billing Address	Mrs. Ana Flávia Oliveira Evaristo F. F. da Costa Curitiba, Brazil 80050-540 Attn: Mrs. Ana Flávia Oliveira
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

NEXO 2 – PEDIDO DE DEPOSITO DE PATETENTE

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

06/06/2017 870170038208 10:43

00.000.2.2.17.0250979.0

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 011953 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 75095679000149
Nacionalidade: Brasileira
Endereço: Rua João Negrão, 280 2o andar
Cidade: Curitiba
Estado: PR
CEP: 80010-200
País: Brasil
Telefone: (41) 3360 7441
Fax: (41) 3360 7416
Email: inovacao@ufpr.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Obtenção de polissacarídeos do balsamo (Sedum dendroideum) e o uso dos polissacarídeos como agentes gastroprotetores, anti-inflamatórios e moduladores da função imune em humanos
Resumo: A presente invenção consta da produção de polissacarídeos a partir das folhas de balsamo (Sedum dendroideum) e o uso dos polissacarídeos como agentes gastroprotetores, anti-inflamatórios e modulador da função imune em humanos.
Figura a publicar: 01

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 06/06/2017 às 10:43, Petição 870170038208