UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

ESTUDO QUÍMICO, FÍSICO-QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NO FITOTERÁPICO (XAROPE MELXI®).

CATARINA MICHELLE DE OLIVEIRA FERREIRA

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria da Paz Carvalho da Silva
Co-orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria do Carmo Barros Pimentel
Co-Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Recife-PE
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

ESTUDO QUÍMICO, FÍSICO-QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NO FITOTERÁPICO (XAROPE MELXI®).

Dissertação apresentada pela Mestranda Catarina Michelle de Oliveira Ferreira, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

CATARINA MICHELLE DE OLIVEIRA FERREIRA

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria da Paz Carvalho da Silva
Co-orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria do Carmo Barros Pimentel
Co-Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Recife-PE
2006

Ferreira, Catarina Michelle de Oliveira

Estudo químico, físico-químico e farmacológico dos carboidratos presentes no fitoterápico (Xarope Melxi). / Catarina Michelle de Oliveira Ferreira. – Recife: O Autor, 2006.

36 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Bioquímica, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Carboidratos 2. Fitoterápicos 3. Estudos farmacológicos. Título.

577.114	**CDU (2.ed.)**	**UFPE**
572.56	***CDD (22.ed.)***	***CCB – 2006 -017***

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Catarina Michelle de Oliveira Ferreira,** realizada em 24 de fevereiro de 2006, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:10 horas, do dia 24 de fevereiro de 2006, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo de Barros Lins – Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Catarina Michelle de Oliveira Ferreira**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, Vice-Coordenadora do Curso supra citado, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Maria da Paz Carvalho da Silva, na qualidade de Presidente, Nicácio Henrique da Silva, ambos do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho, do Depto. de Biofísica e Radiobiologia/CCBUFPE e Glícia Maria Torres Calazans, do Depto. de Antibióticos/CCB/UFPE. Após as apresentações, a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva passou a palavra para a Sra. Presidente que convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Estudo Químico, Físico-Químico e Farmacológico dos Carboidratos Presentes no Fitoterápico (Xarope Melxi®)",** e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinqüenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de argüição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 30 minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Glícia Maria Torres Calazans que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua argüição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Daí a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria Teresa Jansen de Almeida Catanho, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua argüição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeito. Em seguida, a Sra. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua argüição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 24 de fevereiro de 2006.

Dedicatória

Aos meus pais, que me ensinaram a ter determinação, integridade, caráter e lutar pela vida.

AGRADECIMENTOS

À minha Família, Pais (Carlos e Gilvanete), irmãos (Carla e Carlos) pelos melhores momentos que tive o prazer em compartilhar, pelo eterno apoio, estímulo, carinho, confiança depositada e paciência, agradeço.

Ao Departamento de Bioquímica (UFPE) pela oportunidade de realiza o mestrado em bioquímica.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa.

A minha orientadora, Prof[a]. Dr[a] Maria da Paz Carvalho da Silva, pelo carinho, ensinamentos científicos e de vida e a dedicação que teve com a pesquisa.

Aos meus co-orientadores Prof[a]. Dr[a]. Maria do Carmo Barros Pimentel e Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho pelos ensinamentos científicos

Ao Professor Dr. Nicácio Henrique da Silva pela enriquecedora contribuição científica.

A Prof[a]. Dr[a] Glicia Maria Torres Calazans pelo carinho, dedicação e ajuda nos experimentos realizados.

A Prof[a]. Maria Tereza Jansen de Almeida Catanho pela dedicação em etapas determinantes para a continuidade da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Haroudo S. Xavier pela valiosa ajuda com etapas da pesquisa.

A Prof[a]. Dr[a] Elizabete Chaves por sua compreensão e carinho.

Aos professores do Mestrado em Bioquímica por transmitir seus conhecimentos para formação acadêmica dos futuros pesquisadores.

Ao Aluno Márcio Vasconcelos, amigo e aluno de Iniciação Científica do Pibic pela preciosa ajuda nos momentos importantes para o desenvolvimento dos experimentos.

A Roberto de Sá, amigo e aluno do doutorado de Química, pelas prestimosas dicas, conselhos, apoio e ajudas nos experimentos, nos momentos em que mais precisei.

A Vanessa pela ajuda científica e apoio prestado.

Aos colegas do Mestrado: Suzan, Natália, Vanessa, Cynthia, Sérgio, Mariana, Braz, Daniele, Ana Catarina, Ana Cristina, Carolina, Alexandro e Eduardo em especial a amiga Suzan Diniz pelos felizes momentos que juntos tivemos.

A todos os alunos e pesquisadores que fazem ou que fizeram parte do laboratório de Bioquímica no LIKA pelos momentos compartilhados, em especial a Karla Caju pela grande força prestada quando necessitei.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE: Djalma, Miron, Helena, Albérico, Flávio, João, Neide e demais funcionários pela prestimosa ajuda.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami: Otaviano e demais funcionários pela atenção e dedicação fundamentais nas diversas etapas deste estudo.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	**v**
LISTA DE FIGURAS	**Vii**
LISTA DE TABELAS	**Viii**
ABREVIATURAS	**ix**
RESUMO	**X**
ABSTRACT	**Xi**
1. INTRODUÇÃO	**1**
1.1 A indústria de medicamentos e a fitoterapia	**1**
1.2. Carboidratos	**1**
1.3. Mel	**3**
1.4. Ações Farmacológicas	**6**
1.5. Ação Antiinflamatória	**7**
1.6. Abacaxi	**8**
2. OBJETIVOS	**11**
2.1. Gerais	**11**
2.2. Específicos	**11**
3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO	**11**
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	**12**
5. ARTIGO CIENTÍFICO	**21**
6. CONCLUSÃO	**35**
7. ANEXOS	**36**

LISTA DE FIGURAS

Página

Dissertação

Figura 1 - Thin layer chromatography to detect flavonoids present in the carbohydrates extracted from Melxi®. **31**

Figura 2 - Paper descending chromatography of carbohydrates extracted from the phytotherapic Melxi®. **32**

Figura 3 - Thin layer chromatography of carbohydrates standards and samples extracted from phytotherapic Melxi®. **32**

Figura 4 - Thin layer chromatography of carbohydrates standards and samples extracted from phytotherapic Melxi®. **33**

Figura 5 - HPLC chromatogram profiles of carbohydrates standards and samples extracted from phytotherapic Melxi®. . **33**

Figura 6 - Antinflammatory Activity Assay of carbohydrates sample $CM2^{a}$/NH extracted from Melxi®. **34**

LISTA DE TABELAS

Página

Dissertação

Tabela 1 – – Amount of total and reducing sugars, protein content and carbohydrates yield obtained in two extractions. **31**

Tabela2 – Sensitivity assay of the microorganisms to the carbohydrates extracted from Melxi®. **31**

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
HLPC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
µl	Microlitro
g	Grama
g/kg	Grama por kilograma
g/ml	Grama por mililitro
i.p.	Intraperitoneal
ml/min	Mililitro por minuto
min	Minutos
RT	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
DPA	Difenilalanina
µg/ml	Micrograma por mililitro
kg	Kilograma
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por kilograma
mg/ml	Miligrama por mililitro
ml	Mililitro
ml/kg	Mililitro por kilograma
CM/NH	Carboidratos do Melxi® – Não hidrolizado.
CM/2h	Carboidratos do Melxi® - 2 horas de hidrólise.
CM/4h	Carboidratos do Melxi® - 4 horas de hidrólise
CM1ª/NH	Carboidratos do Melxi® 1◦ extração – Não hidrolizado.
CM2 ª /NH	Carboidratos do Melxi® 2◦ extração – Não hidrolizado
CM1 ª /2h	Carboidratos do Melxi® 1◦ extração - 2 horas de hidrólise
CM1 ª /4h	Carboidratos do Melxi® 1◦ extração - 2 horas de hidrólise
CM2 ª /2h	Carboidratos do Melxi® 2◦ extração - 2 horas de hidrólise
CM2 ª /4h	Carboidratos do Melxi® 2◦ extração - 2 horas de hidrólise
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
HCl	Àcido clorídrico

RESUMO

Melxi® é um fitoterápico produzido e comercializado pelo Laboratório Hebron. Composto basicamente por mel e abacaxi (*Ananas comosus*), o qual é usado como expectorante e fluidificante das secreções brônquicas e das vias aéreas superiores. O mel de abelha possui uma excelente qualidade nutricional (vitaminas, minerais, valor energético elevado) e propriedades medicinais (ação antioxidante e antisséptica). Dentre os açúcares existentes no mel, os monossacarídeos constituem a maior parte, variando de 85% a 95% da sua composição. O abacaxi não é fruta calórica, mas seu conjunto contém altas porcentagens de vitaminas A, B e C, assim como carboidratos, sais minerais e fibras, é fonte da enzima proteolítica bromelina, desta forma sendo excelente adjuvante da digestão. O presente trabalho objetivou analise os carboidratos presentes no Melxi®. O fitoterápico foi tratado com acetona para deslipidação e submetido à proteólise usando a enzima papaína. Os carboidratos extraídos foram analisados e caracterizados por dosagens espectrofotométricas, cromatografias de papel, camada delgada e de alta eficiência (HLPC), utilizando a coluna aminex HPX 87C da BioRad, fase móvel a água, velocidade de fluxo constante de 0,6 mL minuto^{-1}, detecção por índice de refração e a temperatura de 85°C. A amostra após proteólise apresentou uma contaminação protéica inferior a 10µg/mL. Não foi identificada a presença de flavanóides na amostra de carboidratos extraída. A quantidade de açúcares neutros variava em torno de 5,4 mg/ml. As cromatografias de papel e camada delgada revelaram os seguintes carboidratos: sacarose, sorbitol, frutose, maltose, melezitose e glicose. E através da análise cromatográfica por HPLC foram observados 4 picos, correspondentes aos seguintes açucares: melezitose, sacarose, glicose e frutose. As Amostras do Melxi analisadas apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *E. coli, Streptococcus sp e Pseudomonas aeruginosa.* Observou que na atividade antiinflamatória o produto na dose de 1000 mg / Kg apresentou um percentual de redução de 57,72, uma inibição melhor que o AAS (padrão). Concluindo que o Fitoterápico (Melxi®) possui importantes carboidratos na sua composição com valiosas ações farmacológicas.

ABSTRACT

Melxi® syrup is a phytotherapic produced and commercialized by Hebron Laboratory. It is basically composed by honey and pineapple pulp (*Ananas comosus*) which is used as expectorant and mucolytic agent. The honey possesses an excellent nutritional quality (vitamins, minerals, high energetic value) and medical properties (antioxidant and antiseptic activities). Monosaccharides constitute the major part among the sugars found in the honey, varying from 85% and 90% of its composition. Pineapple is not a caloric fruit however it contains high percentage of vitamins A, B and C, and also carbohydrates, mineral salts and fibres. It is the source of the enzyme bromelain, which is an excellent auxiliary for digestion. The objective of this work was analyse the carbohydrates present in the Melxi. The phytotherapic was treated with acetone for delipidation and subjected to proteolise by using the enzyme papain. The carbohydrates extracted was chemically and physicochemically analysed by spectrophotometry, paper chromatography, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). Samples after proteolise presented a protein contamination lower than 10μg/mL. The presence of flavonoids was not identified in the carbohydrate extracted. The content of neutral sugars was around 5.4 mg/mL. Paper and thin layer chromatografies revealed the following carbohydrates: sucrose, sorbitol, fructose, maltose, melezitose and glucose. In the HPLC chromatograms were observed four peaks corresponding to melezitose, sucrose, glucose and fructose. Melxi syrup samples showed antimicrobial activity by inhibiting the *Escherichia coli*, *Streptococcus sp* and *Pseudomonas aeruginosa* growth. In the anti-inflamatory activity it was observed 57.72% of reduction inflammation in the mouses which was higher than by using AAS as standard. Then It can conclude that Melxi contains important carbohydrates with pharmacological activities.

1. INTRODUÇÂO

1.1 A Indústria de Medicamentos e a Fitoterapia

A indústria Farmacêutica mundial tem um faturamento anual que ultrapassa os 10 bilhões de dólares e o Brasil, se situa entre os dez maiores consumidores de medicamentos do mundo (FERREIRA, 1998). Encontra-se, no entanto, embutida nestas cifras, uma significativa demanda reprimida com apenas 23% da população, consumindo 60% da produção de medicamentos (BERMUDEZ, 1995). Este fato vem reforçar a sugestão da existência de uma cultura popular historicamente voltada para utilização da medicina caseira, onde a Fitoterapia se apresenta como recurso considerável, às vezes, no alívio para os mais diversas doenças.

No Brasil, estima-se que o mercado de fitoterápicos tenha alcançado em 2001 a casa dos US$ 550 milhões, o que representa um crescimento de 10% em relação ao ano de 2000. Levando em consideração o saber popular, na tentativa de suprir a falta de recursos financeiros para o setor saúde, implantou-se em 1983, na cidade de Olinda (Pernambuco-Brasil), o primeiro programa de fitoterapia em Serviço de Saúde Pública. Este serviu de estímulo a outros projetos, e hoje há vários programas de destaque em muitos municípios ou Estados. Nesta sua revitalização, porém a fitoterapia abandona rapidamente seu empirismo inicial, agora se apresentando respaldada por um crescente número de pesquisas e estudos, dando conta de constituintes químicos ativos e de novas tecnologias, o que poderia ser traduzido como uma síntese da relação dialética entre o saber popular e o conhecimento científico (ARAÚJO, 2000).

O xarope fitoterápico (Melxi) produzido e comercializado pelo laboratório Hebron S.A. é composto basicamente por mel de abelha e polpa de abacaxi (*Ananás comosus*), o qual tem sido administrado como expectorante e fluidificante.

1.2 CARBOIDRATOS

Os carboidratos ocupam uma posição importante na química do processo vital. Estes compostos são formados nas plantas, a partir da

fotossíntese, e constituem o principal produto do processo pelo quais as moléculas inorgânicas e a energia solar é incorporada aos seres vivos. O carboidrato celulose, um polímero de massa molecular elevadas, constituído de unidades de glicose, é um importante componente estrutural das plantas. Nos animais, o metabolismo dos carboidratos é uma das fontes de energias mais relevantes. Glicídios (ou carboidratos, ou sacarídeos) são compostos aldeidicos ou cetônicos com múltiplas hidroxilas. Constitui a maior parte da matéria orgânica na terra, devido a suas múltiplas funções em todas as formas de vida. O termo carboidrato refere-se a sua formula mínima $Cn(H_2O)n$ que aparenta ser constituído de carbono e água, mas há exceções de carboidratos sem essa fórmula. Os termos glicídios e sacarídeos, do grego *Glýcis* e do latim *scasharum*, que significa doce, também são imprecisos, pois nem todos são doces e há substancias doces não glicídicas (STRYER, 2002).

Os carboidratos representam a maior porção de matéria seca do mel, sendo responsável por suas qualidades e propriedades físicas: viscosidade propriedades térmicas, higroscópicas, granulométricas, valor energético e atividade antibacteriana (CRANE, 1975, 1990; WHITE JÚNIOR, 1979).

Dentre os açucares existentes no mel, os monossacarídeos constituem a maior parte, variando de 85% a 95% da sua composição (HORN; DURÁN; CORTOPASSI-LAURINO et al 1996.).

A fração monossacarídica do mel é composta basicamente pelos açúcares simples frutose e glucose. A presença desses monossacarídeos no mel foi descrita em uma série de trabalhos. Em 1954, por exemplo, 21 fontes de mel que representavam 19 fontes florais diferentes foram analisadas através de cromatografia de adsorção seletiva e de métodos analíticos descritos anteriormente na literatura (p.ex. polarimetria). Os resultados obtidos demonstraram que a fração monossacarídica desses méis consistia de glicose e frutose. Em 1975 foi descrito um método simples para a detecção e quantificação da frutose e da glicose em amostras de mel empregando-se a cromatografia gasosa – CG (WOOD; SIDDIQUI & WEISZ; 1975). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também pode ser empregada de modo eficaz para a análise dos dois monossacarídeos em questão (FÖLDHÁZI & COSTA, 1994; ALBUQUERQUE; TRUGO; QUINTEIRO et al, 1999).

Em alguns trabalhos constatou-se a presença de outros monossacarídeos, mas encontrados em pequena proporção e relacionados com a origem floral do mel: xilose, ribose, arabinose, manose, galactose (CRANE, 1975, 1990; SWALLOW & LOW, 1990; ASTWOOD LEE & MANLEY-HARRIS, 1998).

Alguns autores verificaram vários di-e-trissacarídeos, tais como: sacarose, trealose, maltose, isomaltose e rafinose (quantidade total inferior a 10%) entre os tipos de mel (MOHAMED, AHMED & MAZID et al, 1982; LOW & SPORNS, 1988; SABATINI, PERSANO-ODDO, PIAZZA et al., 1989; FÓLDHAZI, 1994; GOODBALL, DENNIS, PARKER et al., 1995). Em estudos recentes, verificou-se a presença de alguns dissacarídeos que não ultrapassa 4% na composição total dos carboidratos do mel: trealose, kojibiose, isomaltose, maltose entre outros, dos quais são encontrados dependendo do tipo de açucares presentes nas plantas que contribuem para formação do mel (CRANE, 1975, 1990; SWALLOW & LOW, 1990, 1994; SERRA BONVEHÍ & VENTURA-COLL, 1995; ASTWOOD, LEE & MANLEY-HARRIS, 1998).

Dentre os dissacarídeos a sacarose representa 2 a 3% dos carboidratos. Ela pertence aos oligossacarídeos e resultam em dois monossacarídeos, frutose e glicose, ao sofrer hidrólise pela ação de ácidos diluídos ou enzimas (invertase) (VIDAL & FREGOSI, 1984).

1.3 MEL

O mel é um produto viscoso, adocicado e geralmente de aroma agradável, apreciado, segundo alguns relatos, desde a Grécia antiga (DUSTMANN et al, 1993) Sua qualidade nutricional (vitaminas, minerais, valor energético elevado), suas propriedades medicinais: ação antioxidante e antisséptica relacionada aos compostos fenólicos e suas propriedades sensoriais tem atraído milhares de consumidores (ZUMLAI & LULAT, 1989).

O mel tem sido utilizado como um agente antibacteriano para o tratamento de feridas, desde os tempos mais remotos. Nos nossos dias, parece ser visto como uma alternativa à utilização dos antibióticos que, neste momento, estão a causar preocupação devido ao aparecimento de bactérias resistentes (HENRIQUES, 2004).

O mel é reconhecido, desde os primórdios da civilização, pelas suas propriedades medicinais freqüentemente, os méis de melato são classificados em 2 tipos: aqueles ricos em melezitose que são sujeitos à granulação, e os ricos em erlose que não sofrem granulação. A fração monossacarídica do mel é composta basicamente pelos açúcares simples frutose e glicose (MOREIRA, 2001).

Referências à sua utilização na medicina tradicional foram encontradas em papiros egípcios de há 10 000 anos. Os registros que mencionam a utilização deste produto como medicinal, referem a sua utilização para o tratamento de diversas doenças, que variam desde as anemias, úlceras de estômago, feridas, queimaduras, a problemas oftálmicos (HENRIQUES, 2004).

Como o mel é resultado da desidratação e transformação do néctar, a quantidade de mel que pode ser obtida de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração do néctar e, ainda, com as concentrações e proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando o néctar (CRANE, 1990.). A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar de cada espécie vegetal produtora, conferindo-lhe características específicas enquanto que as condições climáticas e o manejo do apicultor têm influência menor (WHITE, 1978).

O conteúdo de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade. A água presente no mel apresenta forte interação com as moléculas dos açúcares, deixando poucas moléculas de água disponíveis para os microrganismos (VERÍSSIMO, 1987). O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% (MENDES & COELHO, 1983). Apesar de a legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. Entretanto, níveis bem acima desses valores já foram encontrados por diversos pesquisadores em diferentes tipos de mel (CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, 1991; COSTA, ALBUQUERQUE, TURGO et al., 1989; AZEREDO, 1999; SODRÉ, 2000; MARCHINI, 2001).

Os componentes menores do mel, como os materiais flavorizantes (aldeídos e álcoois), pigmentos, ácidos e minerais, influenciam

consideravelmente nas diferenças entre tipos de mel. SABATIER *et al.* (1992) detectaram alguns flavonóides presentes no mel de girassol (conhecidamente rico em flavonóides).

Dentre as inúmeras propriedades medicinais atribuídas ao mel pela medicina popular e que vêm sendo comprovadas por inúmeros trabalhos científicos, sua atividade antimicrobiana talvez seja seu efeito medicinal mais ativo, sendo que não apenas um fator, mas vários fatores e suas interações são os responsáveis por tal atividade (SATO et al., 2000).

Segundo ADCOCK (1962), MOLAN (1992) E WAHDAN (1998), os responsáveis por essa habilidade antimicrobiana são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, e substâncias voláteis, como os flavonóides e ácidos fenólicos.

De maneira geral, destinam-se ao mel inúmeros efeitos benéficos em várias condições patológicas.

Propriedades antissépticas, antibacterianas também são atribuídas ao mel, fazendo com que ele seja utilizado como coadjuvante na área terapêutica em diversos tratamentos profiláticos (STONOGA & FREITAS, 1991). Sua propriedade antibacteriana já foi amplamente confirmada em diversos trabalhos científicos (ADCOCK, 1962; WHITE & SUBERS, 1963; WHITE, SUBERS & SCHEPARTZ, 1963; SMITH et al., 1967; DUSTMANN, 1979; MOLAN et al., 1988; ALLEN, MOLAN & REID, 1991; CORTOPASSI-LAURINO & GELLY, 1991), como também sua ação fungicida (EFEM et al., 1992), cicatrizante (BERGMAN et al., 1983 e EFEM, 1988; GREEN, 1988 e GUPTA et al., 1993) e promotora da epitelização das extremidades de feridas (EFEM, 1988).

Popularmente, ao mel ainda se atribuem outras propriedades como antianêmica, emoliente, antiputrefante, digestiva, laxativa e diurética (VERÍSSIMO, 1987).

Atualmente alguns países, como a França e a Itália já vêm objetivando a produção de mel com propostas terapêuticas específicas, como nos tratamentos de úlceras e problemas respiratórios (YANIV & RUDICH, 1996).

1.4 AÇÃO FARMACOLÓGICA

Uma ampla variedade de produtos naturais tem sido utilizada no tratamento de feridas pela facilidade de utilização, inocuidade, baixo custo e poder bactericida ou bacteriostático. Entre eles destaca-se o mel (MATHEWS & BINNINGTON, 2002).

As propriedades antibacterianas do mel foram associadas com a produção de peróxido de hidrogênio a partir da glicose, da presença de uma substância termolábil denominada inibina, da capacidade higroscópica do baixo valor de pH (EFEM, 1988; SUBRAHMANYAM, 1996; LIPTAK, 1997; MATHEWS & BINNINGTON, 2002). Outras vantagens clínicas do mel incluem a ação antiinflamatória, a ausência de efeitos adversos na cicatrização, a redução de edema, a quimiotaxia de macrófagos e a não-aderência (LIPTAK, 1997; DUNFORD COOPER, MOLAN et al., 2000). Segundo LIPTAK, (1997), as feridas tratadas com mel mostram pouca infiltração neutrofílica e proliferação marcada de angioblastos e fibroblastos. No entanto, conforme a fonte da planta (néctar) e processamento pode haver variação da atividade antibacteriana e eficácia clínica (GREENWOOD, 1993; DUNFORD, COOPER, MOLAN et al, 2000; MATHEWS & BINNINGTON, 2002). DUNFORD, COOPER, MOLAN et al. (2000) afirmaram que, por não ser esterilizado, o mel para consumo não é recomendado para uso em feridas. Ao avaliarem o mel comercial não fervido e solução fisiológica no tratamento de feridas em ratos, BERGMAN, YANAI, WEISS et al. (1983) concluíram que, histologicamente e pela mensuração do tamanho das lesões, o mel acelerou o processo de cicatrização.

NDAYISABA, BAZIRA, HABONIMANA et al. (1993), ao empregarem o mel em feridas de várias origens em 40 pacientes humanos, obtiveram cura em 88% dos casos. Alguns microrganismos foram encontrados na ferida ao final da cicatrização, mas não interferiram no processo de cura.

Nove crianças com feridas pós-cirúrgicas infectadas crônicas e sem sucesso com os métodos convencionais, foram tratadas por VARDI et al. (1998), com mel comercial não processado. Observou-se acentuada melhora clínica após cinco dias do tratamento, com cicatrização completa após 21 dias e sem sinais de reação adversa.

Um total de 104 casos de queimaduras superficiais em humanos foi estudado por SUBRAHMANYAM (1991), para avaliar a eficiência do curativo

com mel não processado coberto com gaze estéril e bandagem ou tratamento com sulfadiazina de prata impregnada em gaze. Das feridas tratadas com mel, 87% cicatrizaram dentro de 15 dias contra 10% do outro grupo. Entre outras vantagens encontramos o alívio da dor, a menor incidência de cicatriz hipertrófica e contratura, o baixo custo e a fácil disponibilidade do produto.

SUBRAHMANYAM (1991) sugere que o mel é eficaz para o tratamento de feridas da queimadura porque: 1) impede a infecção por causa de sua atividade antibacteriana ou propriedade bacteriostática (isto é, inibe o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas). 2) fornece uma barreira viscosa à invasão fluida da perda e da ferida pelas bactérias que impedem assim a infecção. 3) absorve o líquido do edema (pus) que limpa desse modo à ferida. 4) reduz a dor e a irritação e elimina o cheiro ofensivo.

A atividade antibacteriana do mel é parcialmente devido a seus efeitos osmótico (MOLAN, 1992). As bactérias que causam a infecção são incapazes de sobreviver no mel porque se tornam desidratadas. MOLAN (1992) comparou a atividade antibacteriana do mel natural às soluções artificiais (isto é, soluções supersaturadas do mel dos açúcares da mesma proporção que aqueles no mel). Os resultados mostraram que estas soluções artificiais do mel não tiveram o mesmo grau de atividade antibacteriana que o mel natural, indicando que a remoção da água das bactérias foi importante.

A presença do peróxido de hidrogênio gerada pela atividade enzimática da glucose oxidase na glucose no mel diluído contribui também para sua atividade antibacteriana (MOLAN, 1992). Porque o peróxido de hidrogênio gera os radicais livres altamente reativos que reagem e matam bactérias.

1.5 AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA

A resposta inflamatória aguda é caracterizada por um aumento a permeabilidade vascular e infiltração celular que conduz à formação do edema, em conseqüência o extravasão do líquido e as proteínas e a acumulação dos leucócitos no local inflamatório. O edema da pata do rato é um teste extensamente usado para determinar a atividade antiinflamatória, e foi caracterizado inteiramente no passado (DI ROSA *et al* ., 1971a , 1971b ; 1972). Mais recentemente, mostrou-se que Cox-2 (cicloxigenase-2) alcança a expressão máxima 1 h da injeção local da carraginina (NANTEL, DENIS,

GORDON *et al* .1999). O edema da pata do rato vem sendo usado cada vez mais para testar drogas antiinflamatórias novas e estudar os mecanismos envolvidos na inflamação. Encontramos que há principalmente três artigos que são citados extensamente, que é LEVY (1969) ; SUGISHITA AMAGAYA, OGIHARA. (1981) ; HENRIQUES, SILVA, MARTINS et al (1987) .

LEVY em 1969 descreveu que a injeção do carraginina 1% na pata do rato causa um edema similar. Aproximadamente 12 anos mais tarde, SUGISHITA, AMAGAYA S., OGIHARA et al (1981) caracterizaram mais a fase aguda do edema da pata do rato usando o carraginina 3%. HENRIQUES et al (1987) mostraram que a injeção do carraginina na pata do rato induz um edema bifásico. A primeira fase é caracterizada por um edema de pouca intensidade, enquando a segunda fase se dá após 24 h, apresentando um edema mais pronunciado com um efeito máximo entre 48 e 72 h.

1.6 ABACAXI

O abacaxi (*Ananas comosus)* pertence à família *bromeliaceae* e tem origem na América Central e México. O fruto possui várias características, como: é um conjunto dos pequenos frutos que constituem a estrutura de forma ovóide do abacaxi. Na sua porção superior forma-se uma "coroa" de folhas duras, de coloração verde intensa denominada brácteas. A haste interna do abacaxi é envolta pela suculenta polpa que é comestível. Considerando-se o abacaxi um autêntico fruto das regiões tropicais e subtropicais, altamente consumido em todo o mundo, tanto ao natural como na forma de produtos industrializados, era de se esperar que o Brasil tivesse uma participação mais efetiva no mercado internacional deste fruto (CARVALHO & BOTREL, 1996). Sabe-se, entretanto, que o país está muito aquém do que é capaz de produzir (ABREU, CARVALHO & GONÇALVES, 1998).

A maior parte da exportação brasileira de abacaxi se dá na forma de fruta fresca, exigindo cuidados especiais na fase de colheita, pós-colheita, e, particularmente, no transporte, o qual deve ser realizado sob refrigeração (CARVALHO & BOTREL, 1996).

Para o cultivo**,** é de preferência solo rico em nutrientes, não suportando os encharcados. O plantio é feito no início das chuvas desenvolvendo-se bem

em locais de temperaturas entre 16° e 20° C e livres de geadas. Produz 20 kg por planta ao ano e frutifica o ano todo, sendo de perfume forte e sabor variado, ora dulcíssimo, ora bastante ácido. Esse conjunto de frutos do abacaxi possui uma polpa refrescante e cheia de caldo. Tais virtudes o recomendam como fruta que se presta à produção de compotas, doces cristalizados, geléias, sucos, sorvetes, cremes, gelatinas e pudins. No Brasil faz-se também uma bebida, chamada alua bastante conhecida e apreciada no nordeste: deixam-se as cascas do abacaxi imersas em água por alguns dias, até que se processe a sua fermentação (SILVA, 2005)

O abacaxi é, seguramente, uma das frutas tropicais mais populares do mundo, sendo muito utilizada no preparo de coquetéis de espírito festivo, tais como a mundialmente famosa pina colada, feita com suco de abacaxi e rum.

Os principais produtos da industrialização do abacaxi, tanto no Brasil quanto no exterior, são a fruta em calda e suco pasteurizado (simples ou concentrado) (CANTARELLI, 1982), seguido pela produção de geléias e geleadas. Alguns trabalhos mostram a viabilidade de se produzir etanol de uso farmacêutico (BAN, KOVADIO, K. G.; KOVADIO, N. et al, 1988), vinhos (LIMA, 1992), ácido cítrico, vinagre, (DE MARTIN, SOUZA JUNIOR, LARA et al, 1978; LAVIGNE, 1980; CANTARELLI, 1982; LANCRENON, 1982), amido comercial e larga utilização na alimentação animal (CARVALHO, CUNHA, PAULA et al, 1985).

O abacaxi não é fruta calórica, mas seu conjunto contém altas porcentagens de vitaminas A, B e C, assim como carboidratos, sais minerais e fibras. Além disso, dos restos do abacaxizeiro pode-se extrair a bromelina, uma enzima nobre que ajuda a decompor proteínas, resultando dessa extração um bagaço consistente que pode ser utilizado como ração animal. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de abacaxi, com mais de 700 mil toneladas anuais, perdendo, no início dos anos 90, apenas para a Tailândia, para as Filipinas e para a China. As principais plantações brasileiras estão concentradas na região Nordeste do país, em especial no Estado da Paraíba; no Triângulo Mineiro; e nos Estados da Bahia e de São Paulo, onde os municípios de Araçatuba e Bauru são os líderes (OLIVEIRA & COUTO, 1985).

O abacaxi é uma fruta deliciosa, muito apreciada em todos os países tropicais. Sua polpa saborosa é ligeiramente ácida, e muito refrescante. Ao

lado das qualidades organolépticas, que o distinguem universalmente, há o seu alto valor dietético, comparável ao das melhores frutas tropicais. Por exemplo, o suco de abacaxi é um alimento energético, pois um copo (150 cm^3) propicia, em média, cerca de 150 calorias ao organismo humano. O teor de açúcar do suco varia, em geral, em torno de 12 a 15%, dos quais aproximadamente 66% são de sacarose e 34% de açúcares redutores (glicose e frutose) (SILVA, 2005).

O abacaxi contém, principalmente, potássio, além de magnésio e cálcio. As vitaminas presentes são muito numerosas. Considera-se o suco de abacaxi uma fonte de vitaminas: A (0,3mg em 100g de suco), vitamina B1 e uma fonte aceitável de vitamina C (8,5mg em 100g em média). É um adjuvante da digestão, em virtude de conter a bromelina, uma mistura de enzimas proteolíticas, que em meio ácido ou alcalino ou neutro transforma as matérias albuminóides em proteoses e peptonas (fragmentos resultantes da destruição enzimática da proteína) (SILVA, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar os carboidratos presentes no Melxi e estudar o efeito farmacológico destes compostos.

2.2 Específico

- Determinar quantitativamente açucares total e redutores;
- Analisar seus componentes sacarídicos por cromatografias: camada delgada, papel e líquida de alta eficiência (CLAE).
- Determinar a atividade antimicrobiana e antiinflamatória dos açúcares.

3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Um aumento significativo do consumo dos medicamentos naturais vem sendo observado, além de ter sido implantado pelo setor de saúde em 1983, na cidade de Olinda (Pernambuco-Brasil), o primeiro programa de fitoterapia em Serviço de Saúde Pública. O estudo de fitoterápicos é de grande importância e relevância, principalmente no que diz respeito à análise de seus componentes, ou seja, a ação destes no combate às doenças que são tratadas com o medicamento. O Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco em parceria com o Laboratório Farmacêutico Hebron teve como propósito estudar os componente e, conseqüentemente, avaliar os efeitos do medicamento fitoterápico Melxi®.

No caso específico do Melxi, o estudo dos carboidratos faz-se necessário, por ser um dos maiores componentes deste fitoterápico, estando marcadamente presente no mel de abelha. A atividade farmacológica desses açúcares é amplamente conhecida e comprovada, principalmente, antibacteriana, antiinflamatória, cicatrizante, etc. Com tudo isso, o estudo dos carboidratos presentes no Melxi, quanto à sua caracterização e ação farmacológica dará mais respaldo à sua aplicabilidade no combate às doenças brônquicas das vias aéreas superiores.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, C. M. P. de; CARVALHO, V. D.; GONÇALVES, N. B. Cuidados pós-colheita e qualidade do abacaxi para exportação. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.19, n.195, p. 70- 72, set. 1998.

ADCOCK, D. The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. *Journal of Apicultural Research*, v.1, p. 38-40, 1962.

ALLEN, K.L., MOLAN, P.C., REID, G. M. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol*, 43: 817-822, 1991.

ALONSO, A. S. Equipamentos e tecnologia de aplicação de defensivos. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. do C. B. A cultura do pessegueiro. Brasília: Embrapa - SPI, 1998. p. 296-317.

ARAÚJO, E.L. Produção de Plantas Medicinas para Programas de Fitoterapia em Saúde Pública. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 40. & Congresso Ibero-Americano sobre Utilização de Plásticos na Agricultura, 2000. São Pedro/ SP. Anais. Sociedade Brasileira de Olericultura, 2000.

ASTWOOD, K., LEE, B.; MANLEY-HARRIS, M. Oligosaccharides in New Zealand honeydew honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46, p. 4958 – 4962, 1998.

AZEREDO, M.A.A. *et al.* Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. *Cienc Tecnol. Alim*, Campinas, v.19, n.1, p.3-7, 1999.

BAN, K.; KOVADIO, K. G.; KOVADIO, N.; KAMENAN, A. Valorization des déchets d`ananas par production d`etanol. Ind. Alim. Agric. v. 105, p. 1243-1248, 1988.

BERGMAN, A.; YANAI, J.; WEISS, J.; BELL, D.; DAVID, M.P. Acceleration of wound healing by topical application of honey: an animal model. American Journal of Surgery, Washington, v. 145, p. 374-376, 1983.

BERMUDEZ, A.Z.B. Indústria Farmacêutica, Estado e Sociedade: Crítica da Política de Medicamentos no Brasil. São Paulo; HUCITEC/SOBRAVIME, 1995.

BLAIR, J.E.; BORMAN, E.K.; BYNOE, E.T.; UPDYKE, E.L.; WILLIAMS, R.E.O. Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation, Atlanta, Ga., United States, Departament of Health, Education and Welfare, Public Health Service.

CANTARELLI, P. R.; Tecnologia de transformação. *In:* Abacaxi, produção, pré-processamento e transformação agro-industrial, Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 31-48, 1982.

CARVALHO, V. D.; BOTREL, N. GORGATTI NETTO, A. et al*.,* Características da fruta para exportação. *In*: Abacaxi para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. 41p. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 23).

CARVALHO, V. O.; CUNHA, G. A. P.; PAULA, M. B.; CHITARRA, M. I. F. Teores de carboidratos no caule de algumas cultivares de abacaxi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 20, p. 197-200, 1985.

CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLY, D. S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des mieis d`abellies africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. *Apidology,* v.22, p. 61-73, 1991.

COSTA, L. S. M.; ALBUQUERQUE, M. L. S.; TURGO, L. C.; QUINTEIRO, L.; BARTH, O. M.; RIBEIRO, M.; MARIA, C. A. B. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin brazilian honeys. Food Chem., Barking, v. 65, p. 347-352, 1999.

CRANE, E. Honey: a comprehensive survey. London: Heinemann, p.608, 1975.
CRANE, E. Bees and Beekeeping: Science, practice and world resources. Oxford: Heinemann Newnes, 1990, 614 p.

DE MARTIN, Z. J.; SOUZA JUNIOR, A. J.; LARA, J. C.; HASHIZUME, J. Processamento: produtos e subprodutos, características e utilização. *In*: Frutas tropicais. 2 – abacaxi da cultura ao processamento e comercialização. ITAL, São Paulo, 95-134, 1978.

DI ROSA M., Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* 24: 89–102, 1972

DI ROSA M., GIROUD J.P., WILLOUGHBY D, A., Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104: 15–29, 1971a.

DI ROSA M., PAPADIMITRIOU J.M., WILLOUGHBY D, A., A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pathol.* 105: 239–256, 1971b.

DUNFORD, C.; COOPER, R.; MOLAN, P.; WHITE, R. The use of honey in wound management. Nursing Standard, London, v. 15, n. 11, p. 63-68,2000.

DUSTMAN, J. H. Antibacterial effect of honey. Apiacta, v.14(1), p.7-11, 1979.

EFEM, S. E. E. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: preliminary observations. *Surgery*, 113: 200-204, 1993.

EFEM, S.E.E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. British Journal Surgery, Oxford, v. 75, n. 7, p. 679-681, 1988.

FERREIRA, S.H. (Org.). Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

Földházi, G.; Analysis and quantitation of sugars in honey of different botanical origin using high performance liquid chromatography. *Acta aliment.v. 23*, p. 299-311, 1994.

GOODBALL, I.; DENNIS, M. J.; PARKER, I et al. Contribution of high performance liquid cromatographic analysis of carbohydrates to authenticity testing of honey. Journal of Chromatography. V. 706, n. ½, p. 353-359, 1995.

GREEN, A. E. Wound healing properties of honey. *British Journal Surgery,* v. 75, n. 12, p. 1278, 1988.

GREENWOOD, D. Wound healing: honey for superficial wounds and ulcers. Lancet, London, v. 341, p. 90-91, 1993.

GUPTA, S. K., SINCH, H., VARSHNEY, A. C. & PRAKASH, P. & SINGH, S. P. Biochemical alterations during wound healing under influence of natural honey and ampicillin in buffaloes. *Indian Veterinary Journal,* v. 70, p.45-7, 1993.

HENRIQUES, A. Mel: um milagre da natureza para o tratamento de feridas? Revisão, 2004. Disponível em: <http:// www.gaif.net/artig**o**s/Mel.pdf>. Acessado em 06/2005.

HENRIQUES, M.G.M.O., SILVA P.M.R., MARTINS M.A., FLORES C.A., CUNHA F.Q., ASSREUY-FILHO J., CORDEIRO R.S.B, Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.* **20**: 243–249, 1987.

HORN, H.; DURÁN, J.E.T.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; ISSA, M.R.C.; TOLEDO, V.A.A. de; BASTOS, E.; SOARES, A.E.E. Méis brasileiros: resultados de análise físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., Teresina, 1996. Anais. Teresina: CBA, 1996, p. 403-429.

LANCRENON, X. Les suis - produits des conserveries d'ananas: une source de sucre pour cette industrie. Ind. Alimentaires et Agricoles, v. 99, n. 7-8, p. 583-88, 1982.

LAVIGNE, M. P. Norte sur la transformation de l'ananas a la mastiniue, Ann. Fals. Chim., 73(783):93-95, 1980.

LEVY L, Carrageenan paw oedema in the mouse. *Life Sci.* **8**: 601–606, 1969.

LIMA, K. G. Estudos da composição química de vinhos de abacaxi. Tese de mestrado, DTA-UFRJ, Rio de Janeiro, 1992.

LIPTAK, J.M. An overview of the topical management of wounds. Australian Veterinary Journal, Artarman, v. 75, n. 6, p. 408-413, 1997.

LOW, N. H.; SPORNS, P. Analysis and quantitation of minor di-and-trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. Journal of Food Science, v. 53, p. 558 – 561, 1988.

MARCHINI, L.C. *Caracterização de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos*. 2001. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

MARKHAN, K.R. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, 1982.

MATHEWS, K.A.; BINNINGTON, A.G. Wound management using honey. Compendium on Continuing Education Practice Veterinary, Princeton Junction, v. 24, n. 1, p. 53-60, 2002.

MENDES, B. A. & COELHO, E. M. Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção. *Informe Agropecúario,* v.9, n.106, p. 56-67, 1983.

MOHAMED, M. A.; AHMED, A. A.; MAZID, M. M.; Studies on Lybian honeys. Journal of Food Quality, v.4, p. 185 – 201, 1982.

MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(1): p.5-28, 1992.

MOREIRA, R. F. A. and DE MARIA, C. A. B.; Sugars in the honey. *Quím. Nova*, July/Aug, vol.24, no.4, p.516-525, 2001.

MORRISON, R.T.; BOYD, R. N.; Química Orgânica 9a. ed.; Lisboa.; Fundação Calouste Gulbenkian.; p.1301-1314, 905-910, 1990.

NANTEL F., DENIS D., GORDON R., NORTHEY A., CIRINO M., METTERS K.M., CHAN C.C, Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 128: 853–859, 1999.

NDAYISABA, G.; BAZIRA, L.; HABONIMANA, E.; MUTEGANYA, D. Clinical and bacteriological outcome of wounds treated with honey. An analysis of a series of 40 cases. Revue de Chirurgie Orthopedique et Reparatrice de L'appareil Moteur, Paris, v. 79, n. 2, p. 111-113, 1993.

OLIVEIRA, M. A.; COUTO, F. A. A. Uso dos restos culturais do abacaxizeiro na alimentação bovina. Informe Agropecuário, Belo horizonte, v. 11, p. 76-78, 1985.

SABATIER, S. AMIOT, M.J. TACCHINI, M. & AUBERT, S. identification of flavonoids in sunflower honey. *J. Food Sci. off. Publ. Inst. Food. Technol. Chicago. ILL.* The Institute. 57: 773-4, 1992.

SABATINI, A. G.; PERSANO- ODDO, L.; PIAZZA, M. G. et al. Glucide spectrum in the main Italian unifloral honeys. 1: Fructose and glucose. Apicultura, v. 5, p. 35 – 46, 1989.

SATO, T. & MIYATA, G. The nutraceutical benefit, Part III: Honey. Nutrition 16:468-469, 2000.

SERRA-BONVEHI, J.; VENTURA-COLL, F. Characterization of citrus honey (*Citrus spp.*) produced Spain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 43, p. 2053 – 2057, 1995.

SILVA, A. F. Abacaxi, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - EMBRAPA, Brasília, Julho 2005. Disponível em: <http:// www.cdt.unb.br>. Acesso em: 15 dez. 05.

SMITH, F. G. Deterioration of the colour of honey. Journal of Apicultural Research, v. 6, n.2, p.95-98, 1967.

SODRÉ, G.S. *Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia. 2000*. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

STONOGA, V.I., FREITAS, R.J.S.D. Conteúdo de água e açúcares em mel de abelhas. *Bd. Ceppa*, Curitiba, v.9, n.1, p.9-16, 1991.

STRYER, L.; Bioquímica.; Rio de Janeiro, R.J.; Editora Guanabara Koogan S.A.; p.438-442, 2002.

SUBRAHMANYAM, M. Honey dressing versus boiled potato peel in the treatment of burns: a prospective randomized study. Burns, Oxford, v. 22, n. 6, p. 491-493, 1996.

SUBRAHMANYAM, M. Topical application of honey in treatment of burns. British Journal Surgery, Oxford, v. 78, p. 497-498, 1991.

SUGISHITA E., AMAGAYA S., OGIHARA Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J. Pharmacobiodyn,* **8**: 565–575, *1981.*

SWALLOW, K. W.; Low, N. H.; Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high performance liquid chromatography. J*ournal of Agric and. Food Chemistry*, v.*38*, p.1828 – 1832, 1990.

SWALLOW, K. W.; Low, N. H.; Determination of honey authenticity by anion-exchange liquid chromatography. *Journal of the AOAC International,* v.77, n. 3, p.695 - 702, 1994.

VARDI, A.; BARZILAY, Z.; LINDER, N.; COHEN, H'.A.; PARET, G.; BARZILAI, A. Local application of honey for treatment of neonatal postoperative wound infection. Acta Paediatrica, Stocholm, n. 87, p. 429-432, 1998.

VERISSIMO, M.T.L. Porque o mel cristaliza. *Apicultura no Brasil*, v.3, n.18, p.14, 1987.

VIDAL, R.; FREGOSI, E.V. de. *Mel:* características, análises físico-químicas, adulterações e transformações*.* Barretos: Instituto Tecnológico Científico "Roberto Rios", 1984.

WAHDAN HAL. Causes of the antimicrobial activity of honey. Infection 1998; 26:26.

WHITE JÚNIOR, J.W. Honey. *Adv. Food Res*, San Diego, v. 22. p.287-374, 1978.

WHITE, J. W. & SUBERS, M.H. & SHEPARTZ, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hudrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta,* v.73, p. 57-70, 1963.

WHITE, J. W. & SUBERS, M.H. Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat. *Journal of Apicultural Research*, v.2, n.2, p. 93-100, 1963.

YANIV. Z., RUDICH, M. Bee Products. Plenum Press, New York. 232p. 1996

ZUMLAI, A. AND LULAT, A. “Honey – a remedy rediscovered” Journal of the Royal Society of Medicine, Vol. 82, p. 384-385, 1989.

5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO PLANTA MÉDICA

ESTUDO QUÍMICO, FÍSICO-QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NO FITOTERÁPICO (XAROPE MELXI®).

CHEMICAL, PHYSICO-CHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES OF CARBOHYDRATES PRESENT IN THE PHYTOTHERAPIC (MELXI® SYRUP)

Ferreira, C. M. O. [1]; Leite, M. V.[1,2]; Sá, R. A.[1]; Calazans, G.M.T[3].; Jansem, M.T.C.[4]; SILVA, N. H.[1,2]; Pimentel, M. C. B.[1,2]; Filho, J. L. L [1,2] and Silva, M. P. C.[1,2]*

[1] Departamento de Bioquímica, [2] Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), [3]Departamento de Antibióticos, [4]Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, CEP 50670901.

*Corresponding author: Tel.: (+55-81) 21268484; Fax: (+55-81) 21268485.
E-mail address: mariapaz@hotlink.com.br)

Key Words: carbohydrates/ phytotherapic, pharmacological studies

INTRODUCTION

It is esteemed that in Brazil, the phytotherapic's market had been reached the value of US$ 550 milions in 2001, this represents a increase of 10 % in regards to 2000 [1].

The phytotherapic syrup (Melxi® - Lote: 0406001) produced and commercialized by Hebron S.A., consists basically of honey bee and pineapple pulp (*Ananas comosus*), which has been used as an expectorant and mucolytic agent.

The carbohydrates have an important position in the chemistry of vital process. These compounds are produced in the plants by photosyntesis and constitute the main product of the process by which the inorganic molecules and the sun energy are incorporated to the life[2].

Honey is a viscous product, sweet and generally with a pleasant aroma appreciates, according some reports, since ancient Greece[3]. Its nutritional

quality (vitamin, minerals, high energetic value), its medicinals properties: antioxidizing and antiseptic action are related to the phenolic compounds and its sensorial properties have been attracted thousands of consumers[4]. Popularlly, it's still attributed to the honey others properties such as: antianemic, emollient, antiputrefying, digestive, laxative and diuretic[5]. The honey has been used as an antibacterial agent to wound's treatment. In our days, it seems to be seen as an alternative to the utilization of antibiotics[6].

The Pineapple is a delicious fruit, very appreciated in all tropical countries. Its pulp tasty is lightly acid and very cooling. By the other side, are their organoleptic qualities that distinguish it universally. It possesses a high dietetic value which is comparable to the bests tropical fruits. The content of sugar in the juice varies, in general, around 12 to 15 %, of which, approximately 66% are sucrose and 34 % are reducer sugars (glucose and frutose)[7].

MATERIAL AND METHODS

Carbohydrates Extraction

Melxi (200ml) was treated with two volumes of acetone under agitation during 12 hours for material delipidation. Acetone was decanted and the residue was placed to dry at 45°C under aeration to obtain the Ketonic powder. Two volumes of 0.15M NaCl were added to the Ketonic powder and pH was adjusted to 8.0 with NaOH. The proteolysis of that material was carried out by using the enzyme papain (15mg per gram of ketonic powder) which was added and incubated at 50°C overnight. The suspension was centrifuged at 10,000 x g during 15 minutes. The supernatant obtained was with an acetone volume.

Identification and Quantification of Neutral/Acidic Sugars

Total sugar were estimated by the phenol/sulphuric acid method according to DUBOIS *et al.* (1956)[8]. The hydrolysed fractions (hydrolysed with 2M HCl for 1 hour) were spotted in Whatman N◦ 1 paper and subjected to two

chromatography systems, the first one with the ethyl acetate: acetic acid: phormic acid: water (72:12:4:16) v/v/v/v.

Protein Determination

Protein content was estimated according to method described by BRADFORD, (1976)[9].

Flavonoids Identification

Samples of 15 μl from CM1 e CM2 were submitted to slender layer chromatography, the used system was ethyl acetate: acetic acid: phormic acid: water (100:11:11:26 v/v/v/v), and revealed with 2-aminodiphenylborinate reagent, proceeded in UV chamber (254 nm). Orange, yellow or green fluorescent spots were used as a criterion to evidence the presence of flavonoids, this method was described by MARKHAN, 1982[10].

Paper Chromatography

Samples were hydrolysed with concentrated HCl for 1, 2 and 4 hours, and then neutralized with 50% NaOH (p/v). Hydrolysed, no hydrolysed samples and the standards (glucose, fructose, sucrose and sorbitol) were spotted in paper Whatman Nº 1. The eluting system used in the chromatography was composed by ethyl acetate: acetic acid: formic acid: water (72:12:4:16 v/v/v/v) and revealed with silver nitrate in alkaline medium according to MAYER & LARNER, 1959[11].

Thin Layer Chromatography

The material was hydrolysed with concentrated HCl for 1, 2 and 4 h, and then the hydrolysed samples were neutralized with 50% NaOH (p/v). Hydrolysed, no hydrolysed samples and the standards glucose, fructose, sucrose, melezitose, maltotriose, maltose, trealose, celulose and sorbitol were spotted in silica's plates, previously pulverized with sodium phosphate 3M. The eluting system used in the chromatography was composed by n-butanol/acetone/phosphate buffer 0,5M, pH=5.0 (4:5:1 v/v/v) and revealed with DPA 1%/aniline 1%/ phosphoric acid 85% (5:5:1 v/v/v).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The chromatography by HPLC was carried out following these conditions: aminex column HPX 87C from BioRad at 85°C, water as the mobile phase, flow rate of 0.6 mL/min, detection by refractive index. Glucose, sucrose, melezitose, maltotriose, maltose, sorbitol and trealose were used as standards.

Microbiological Assay

Seven microorganisms were used in the evaluation of the antimicrobial activity such as: *Pseudomonas aeruginosa* (-) (UFRPE) *Staphylococcus aureus* (+) (DAUFPE 01) *Corinebacteruim sp* (+) (UFPEDA), *Bacillus subtilis* (+) (UFPEDA16), *Klebsiela sp.* (-) (UFPEDA), *Escherichia coli* (-) (UFRPE) and *Streptococus sp* (+) (UFRPE) and all the microorganisms were inoculated in nutritive agar (Mueller Hinton). In that method, filter papers were saturated with the drug and applied to the surface of the agar with microorganisms. Sensitivity and resistance of the microorganisms were determined by size of the growth inhibition zone in mm according to Grove and Randall, 1995[12].

Antinflamatory Assay

The anti-inflammatory activity of composites had been determined according to LEVY, 1969; SIRIVASTAVA et al 2000; SOUZA 2001[13, 14, 15]. The test was carried out with three lots of 10 animals, each group using a crescent concentration of the phytotherapic (Melxi®). Two groups of 5 animals were used as control, five of them as negative control (saline solution – 0.9% NaCl), and five as positive control (acetylsalicylic acid - AAS). The inflammation was induced by using 1% carrageenan (0,1mL) in the subplantar region of the left posterior leg of each animal used control and test. After 30 minutes, in the control groups were injected saline solution (negative control) and AAS (positive control). At the same time, each experimental group received an intra-peritoneal (IP) dose of 250mg/Kg of weight of carbohydrates extracted from Melxi® for the first group, a dose of 500mg/Kg and 1000mg/Kg, for the second and the third experimental groups, respectively.

RESULTS

Two extractions were carried out obtaining different quantities of carbohydrates by using the same procedures. In the first extraction was observed a yield aroud to 2.3 g, with protein contamination lower than 10µg/mL. The content of total and reducer sugar were 1.44 mg/mL and 0.008 mg/mL, respectivelly. In the second extraction was obtained a yield around 5.8g, the amount of total and reducer sugar were 4.7mg/mL and 0.02mg/mL, respectively and with protein contamination lower than 10µg/mL (Table 1).

Flavonoids were not visualized in the material extracted (Figure 1).

Paper descending chromatography revealed the presence of some carbohydrates in the phytotherapic Melxi®: such as: glucose, frutose, sucrose and sorbitol (Figure 2).

Thin layer chromatography revealed traces of maltose and melezitose in no hydrolysed samples (ME1 and ME2). Also, in all analysed samples ($CM1^a$/ 2h; $CM1^a$/4h; $CM1^a$; $CM2^a$/2h; $CM2^a$/4h and $CM2^a$) it was observed the presence of glucose, frutose and sucrose (Figures 3 and 4).

In the chromatographic analysis by using HPLC, the samples $CM1^a$ and $CM2^a$ revealed the presence of glucose, frutose, sucrose and melezitose. Pineapple pulp and honey used in preparation of the phytotherapic were also analysed and the chromatograms showed the presence of glucose and fructose (Figure 5).

The antibacterial activity of the Melxi® carbohydrates was observed by the growth inhibition of *Escherichia coli, Streptococcus sp.* and *Pseudomonas aeruginosa* microorganisms (Table 2).

The antiinflamatory activity in the dose of 1000 mg/kg presented a mouse paw edema reduction of 57,72%, which was better than that one presented by using AAS as positive control (Figure 6).

Discussion

In the experiments realized, the amount and varieties of carbohydrates present are according with the sugars found in honey and pineapple. It was also observed the presence of the monosaccharides in higher quantity as the main

sugars presents in honey, which are in majority, varying from 85% to 95% of its composition[16].

The high performance liquid chromatography has been used as an effective way to detection and analysis of monossacarides and dissacarides. In previous works was related the detection and quantification of frutose and glucose in honey samples by using the same procedure [17, 18].

Di and trisaccharides were identified in the analysed Melxi® samples such as: sucrose, maltose and melezitose. Some authors also detected di and trisaccharides in honey as: sucrose, trealose, maltose, isomaltose e rafinose (total amount lower than 10%) in different types of honey[19, 20, 21]. Recent studies were demonstrated the presence of some disaccharides that not exceed 4% in total composition of honey carbohydrates: trealose, kojibiose, isomaltose, maltose and others, which are found depending of sugar's type found in plants that contributes to the honey formation [22, 23, 24]. In recent literatures it was observed that among the sugars present in pineapple, there are sucrose, glucose and levulose[25]. Two of them were identified as components of the phytotherapic Melxi® (glucose and sucrose).

The carbohydrates extraction was well succeeded: with minimum protein contamination, absence of flavonoids that could be falsifying the results of antimicrobial activity, at once they are responsible for some pharmacologic activity of the medicines.

The antimicrobial activity of the extracted carbohydrates is related to its osmotic effects according to Molan (1992)[26]. The honey is a saturated or hipersaturated solution of sugars and it is said to have osmotic property. The water molecules react strongly with honey sugars, remaining only a small amount of water available to the microorganisms. The bacteria that cause infection can't survive in honey because they became dehydrated. The same mechanism is also attributed to the antimicrobial activity of extracted carbohydrates from Melxi® because it is a hipersatured solution of sugars. Antibacterial activity of honey has been largelly cofirmed in many scientific works[27], as well as its action against fungus and epitelization promoters of the wounds extremities [28].

Mouse paw edema induced by carrageenan has been partially characterized and described by some authors [29, 30]. It could be observed in the majority of the papers that the potential anti-inflammatory activity determination of a new drug follow the same protocol as described by Levy[13] (1969) or Sugishita et al [29] (1981).

REFERENCES

[1]- ARAÚJO, E.L. Produção de Plantas Medicinasi para Programs de Fitoterapia em saúde Pública. In: congresso Brasileiro de Olericultura, 40. & Congresso Ibero-Americano sobre utilização de Plásticos na Agricultura, 2.2000. São Pedro/ SP. Anais. Sociedade Brasileira de Olericultura, 2000.

[2]- STRYER, L.; Bioquímica. ; Rio de Janeiro, R.J.; Editora Guanabara Koogan S.A.; 2002.; p438-442.

[3]- DUSTMAN, J. H. (1979). Antibacterial effect of honey. Apiacta, 14(1), 7-11.

[4]- Zumlai, A.; Lulat, A.; *J. Royal Soc. Med.* 1989, *83*, 384.

[5]- VERISSIMO, M.T.L. Porque o mel cristaliza. *Apicultura no Brasil*, v.3, n.18, p.14, 1987.

[6]- HENRIQUES, A. Mel: um milagre da natureza para o tratamento de feridas? School of Applied Sciences; University of Wales Institute; Wales, Cardiff, UK. Revisão, 2004.

[7]- SILVA, A. F. Abacaxi, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - EMBRAPA, Brasília, Julho 2005. Disponível em: <http:// www.cdt.unb.br>. Acesso em: 15 dez. 05

[8]- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F.. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356, 1956.

[9]- BRADFORD, M. M. Anal. Biochem., 72:248 in Stoscher, C. N. Quantitation of Proteins. Methods in Enzymology, 182 (06): 50-68, 1976.

[10]- MARKHAN, K.R. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, 1982.

[11]- MAYER, F, C. LARNER, J. Substrate eleavage point of the α- and β-amylases. J. Am. Chem. Soc., v. 81, n. 1, p. 188 – 193, 1959.

[12]- GROVE, D.C.; RANDDAL, W. Medical Enclopedia, 76-81, 1995.

[13]- LEVY, L. Carragenan paw edema in the mouse. Life Sci., v.8, p.601-605, 1969.
[14]- SRIVASTAVA, R.M.; MORAIS, L.P.F. de; CATANHO, M.T.J.A.; SOUZA, G.M.L.; SEABRA, G.M.; SIMAS, A.M.; RODRIGUES, M.A.L. Synthesis and antiinflammatory activity of 3-aryl-5-isopropyl-1,2,4-oxadiazoles. Heterocyclic Communications, v.6, n.1, p.41-48, 2000.
[15]- SOUZA, G.M.L, Estudo dos Efeitos biológicos do *Phyllanthus niruri* (qubra-pedra), "*in vivo'* e "*in vivo'.*Mestrado em Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal de Pernambuco,2001,Tese Ms.
[16]- HORN, H.; DURÁN, J.E.T.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; ISSA, M.R.C.; TOLEDO, V.A.A. de; BASTOS, E.; SOARES, A.E.E. Méis brasileiros: resultados de análise físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., Teresina, 1996. Anais. Teresina: CBA, 1996, p. 403-429.

[17]- FÖLDHÁZI, G.; Analysis and quantitation of sugars in honey of different botanical origin using high performance liquid chromatography. *Acta aliment.v. 23*, p. 299-311, 1994.

[18]- COSTA, L. S. M.; ALBUQUERQUE, M. L. S.; TURGO, L. C.; QUINTEIRO, L.; BARTH, O. M.; RIBEIRO, M.; MARIA, C. A. B. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin brazilian honeys. Food Chem., Barking, v. 65, p. 347-352, 1999.
[19]- MOHAMED, M. A.; AHMED, A. A.; MAZID, M. M.; Studies on Lybian honeys. Journal of Food Quality, v.4, p. 185 – 201, 1982.
[20]- LOW, N. H.; SPORNS, P. Analysis and quantitation of minor di-and-trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. Journal of Food Science, v. 53, p. 558 – 561, 1988.
[21]- SABATINI, A. G.; PERSANO- ODDO, L.; PIAZZA, M. G. et al. Glucide spectrum in the main Italian unifloral honeys. 1: Fructose and glucose. Apicultura, v. 5, p. 35 – 46, 1989.
[22]- CRANE, E. Honey: a comprehensive survey. London: Heinemann, 1975. 608p.

[23-] CRANE, E. Bees and Beekeeping: Science, practice and World resources. Oxford: Heinemann Newnes, 1990, 614 p.

[24]- SWALLOW, K. W.; Low, N. H.; Analysis and quantitation of the carboidrates in honey using high performance liquid chromatography. J*ournal of Agric and. Food Chemistry*, v.*38*, p.1828 – 1832, 1990.

[25]- ALONSO, A. dos S. Equipamentos e tecnologia de aplicação de defensivos. In.: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. do C. B. A cultura do pessegueiro. Brasília: Embrapa - SPI, 1998. p. 296-317.

[26]- MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(1): p.5-28, 1992.

[27]- ADCOCK, D. The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys*. Journal of Apicultural Research*, v.1, p. 38-40, 1962.

[28-] EFEM, S. E. E. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: preliminary observations. *Surgery*, 113: 200-204, 1993.

[29-] SUGISHITA E., AMAGAYA S., OGIHARA Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J. Pharmacobiodyn, 1981.* **8**: 565–575.

Table 1 - Determination of total sugar and reducer sugar content; extraction surrender and protein quantification

Extraction	Total sugar	Reducer sugar	Bradford	Extraction surrender
1◦	4,7mg/ml	0,02mg/ml	< 10µg/ml	5,8g

Table 2 – Inibição do crescimento bacteriano

Microorganisms - Gram positive and negative	Inhibition Zone (mm)
Pseudomonas aeruginosa (-)	10
Staphylococcus aureus (+)	-
Corinebacterium sp (+)	-
Bacillus subtilis (+)	-
Klebsiella sp. (-)	-
Escherichia coli (-)	16
Streptococcus sp (+)	18

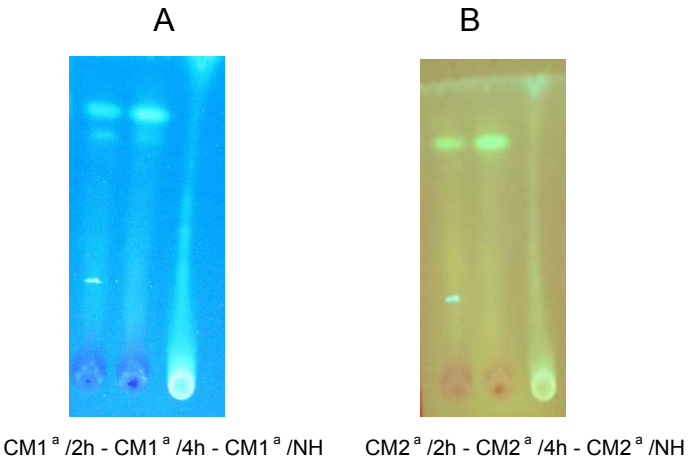


Figure 1 – Thin layer chromatography to detect flavonoids present in the carbohydrates estracted from Melxi®. - CM1 ^{a}/2h (Carbohydrate Melxi® - 1◦ Extraction with 2 horas of Hidrolisys), CM1 ^{a}/4h (Carbohydrate Melxi® - 1◦ with 4 horas of hydrolisys e CM1 ^{a}/NH (Carbohydrate Melxi® - 1◦ no hydrolisys). **B** – CM2^{a}/2h (Carbohydrate Melxi® - 2◦ Extraction with 2 hours of hidrolisys), CM2^{a}/4h (Carbohydrate Melxi® - 2◦ with 4 hours of hidrolisys) and CM2^{a}/NH (Carbohydrate Melxi® - 2◦ no hidrolisys).

Figure 2 - Paper descending chromatography of carbohydrates extracted from the phytotherapic Melxi®. Standards**:** 1-sucrose; 2-sorbitol; 3-frutose, 4- glucose and samples: 5-CM/2h, 6- CM/4h, 7-CM.

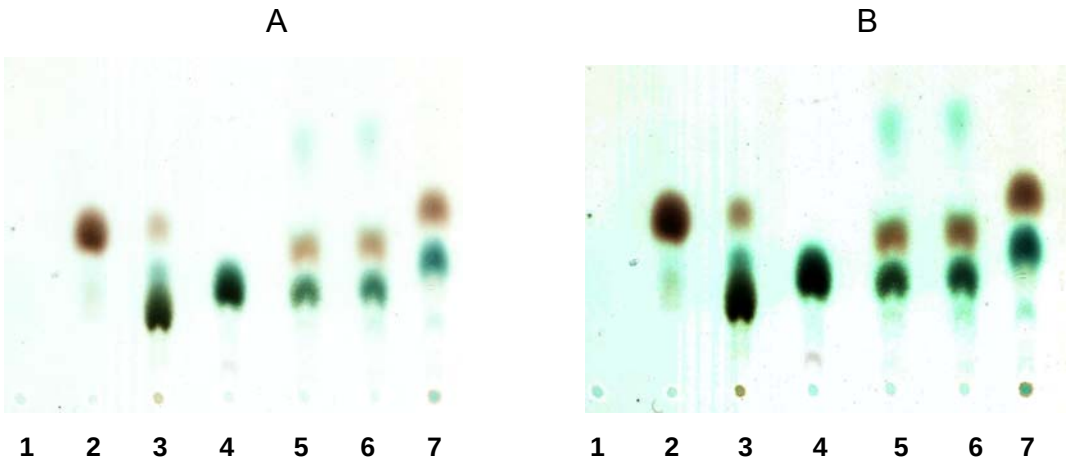
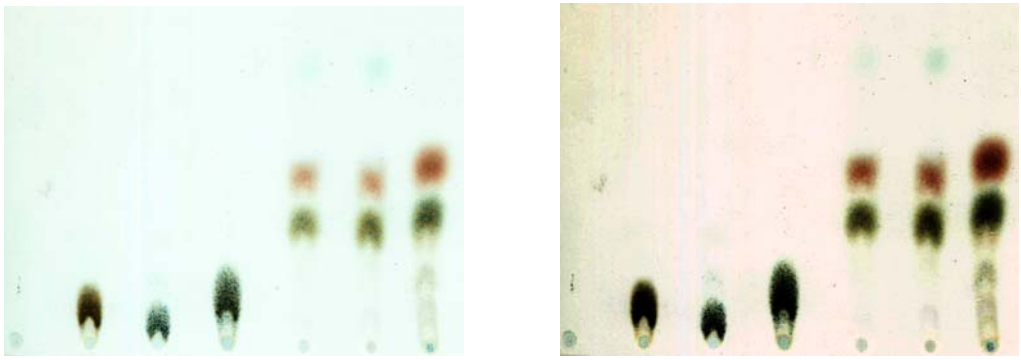
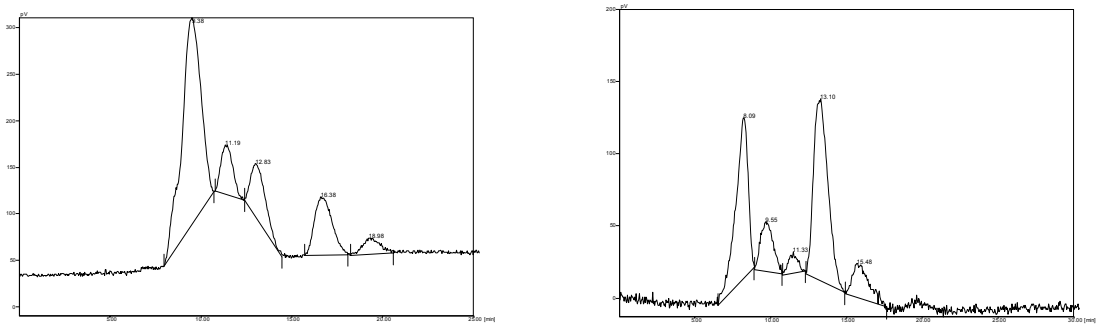


Figure 3 – Thin layer of carbohydrates standards and samples extracted from phytotherapic Melxi®. Standards: 1–Sorbiltol; 2-Frutose; 3-sucrose; 4-glucose; Samples: **A** - CM1 ^{a}/2h (Carbohydrate Melxi® - 1◦Extract with 2h of hidrolisys; CM1 ^{a}/4h (Carbohydrate Melxi® - 1◦ extract with 4 h of hydrolisys and CM1 ^{a}/NH (Carbohydrate Melxi® - 1◦ extract without hydrolisys). **B** – CM2^{a}/2h (Carbohydrate Melxi® - 2◦ Extract with 2 h of hidrolisys), CM2^{a}/4h (Carbohydrate Melxi® - 2◦ extract with 4 h of hidrolisys) and CM2^{a}/NH (Carbohydrate Melxi® - 2◦ extract without hidrolisys).



1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7

Figure 4 – Thin layer of carbohydrates standards and samples extracted from phytotherapic Melxi®. Standards 1–Celulose; 2- Melezitose; 3- Maltotriose; 4- Maltose; Samples: **A** - CM1 [a]/2h (Carbohydrate Melxi® - 1◦ Extract with 2 h of Hidrolisys, CM1 [a]/4h (Carbohydrate Melxi® - 1◦extract with 4 h of hydrolisys and CM1 [a]/NH (Carbohydrate Melxi® - 1◦ extract without hydrolisys. **B** – CM2[a]/2h (Carbohydrate Melxi® - 2◦ Extraction with 2 hours of hidrolisys), CM2[a]/4h (Carbohydrate Melxi® - 2◦ extract with 4 h of hidrolisys and CM2[a]/NH (Carbohydrate Melxi® - 2◦ extract without hidrolisys.



(a) **(b)**

Figure 5 – HPLC chromatogram profiles of carbohydrates standards and samples extracted from phytotherapic Melxi®. – **(a)** Standards solution mixture (glucose, frutose, sucrose, maltose, maltotriose, melezitose, sorbitol and trealose) RT: 9,38 min (trealose)/ RT: 11,19 min (Glucose)/ RT: 12,83 min (fructose) / RT: 16,38 min (sorbitol) / RT: 18,98 min; **(b)** Chromatogram of Melxi sample (10mg/ml). RT: 8,09 min (sucrose)/ RT: 9,55 min(trealose ou melezitose)/ RT: 11,33 min (glucose)/ RT: 13,10 min (fructose)/ RT: 15,48 min (sorbitol)

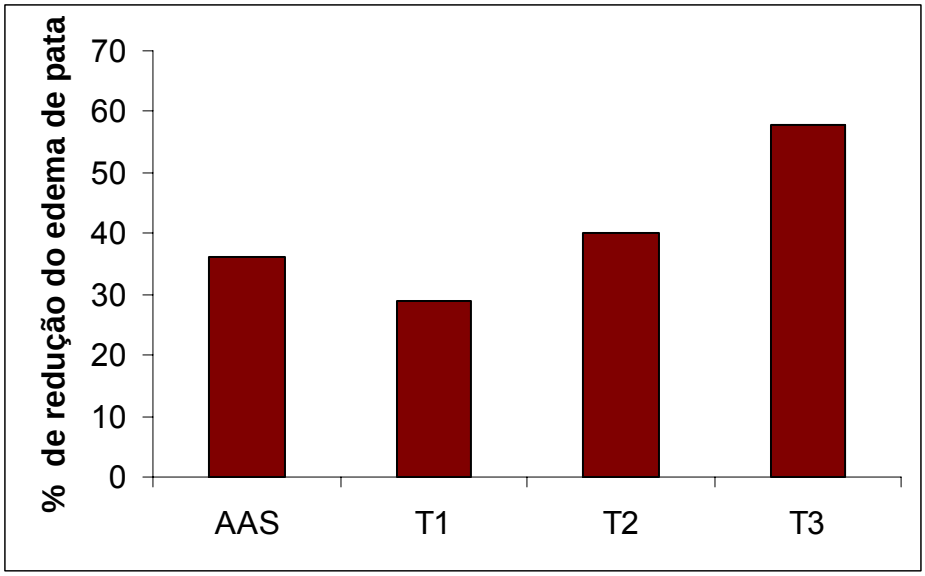


Figure 6 - **ANTINFLAMMATORY ACTIVITY Assay of carbohydrates sample CM2[a]/NH extracted from Melxi®.** AAS (positive control - 1000mg/kg); Melxi samples T1 (250mg/kg), T2 (500mg/kg) and T3 (1000mg/kg).

6. CONCLUSÕES

- O método de extração e purificação foi bastante eficiente, tendo em vista que foi extraído um volume razoável dos carboidratos.
- Dentre os carboidratos existentes no fitoterápico Melxi® encontramos os seguintes açucares: glicose, frutose, sacarose, sorbitol, maltose e melezitose.
- Assim como observado nas literaturas em relação a seus componentes o Melxi® apresentou atividade antimicrobiana frente a algumas bactérias testadas, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli e Streptococcus sp*.
- Os carboidratos do Melxi® apresentam ação antiinflamatória com percentual de redução superior ao antiinflamatório padrão utilizado (ácido acetilsalisílico).

7. ANEXOS

Planta Medica
Guidelines for Authors

Guidelines for Authors

1. Editorial Policy

PLANTA MEDICA Natural Products and Medicinal Plant Research is an international journal devoted to the advancement of research on bioactive natural products and medicinal plants. It appears with 12 issues a year. The following areas of medicinal plants and natural products are covered:

1. Pharmacological and clinical studies
2. Biochemistry and molecular biology
3. Physiology, in vitro biotechnology
4. Natural products chemistry
5. Analytical methods

2. Submission of Manuscripts

All contributions are peer reviewed by independent referees. Only papers that are of highest scientific quality, that are concisely written and that comply with these Guidelines for Authors can be accepted. **Manuscripts which are not in line with these principles may be delayed in the review process or may be returned directly by the Editorial Office to authors.**
Manuscripts can be submitted exclusively via online submission at
http://mc.manuscriptcentral.com/plamed or link via
http://www.thieme.de/plantamedica.
Submissions of hardcopy manuscripts will not be accepted. Please refrain from sending manuscripts via email.
Commonly used text processors should be used for the manuscripts. If possible, the "endnote" function of the text processor should be used for the management of references. Do not submit Powerpoint presentations.
Figures, tables and structural formulas are to be submitted as separate files. They should not be integrated into the text document. The following graphic file formats are preferred: *.tif, *.gif, *.jpg, *.bmp (resolution: 300 dpi).
Language of publication is English. **Manuscripts written by authors whose mother language is not English should be checked by a native speaker before submission. Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to authors.**
Submission of a manuscript to PLANTA MEDICA implies that it represents **original research not previously published and that it is not being considered for publication elsewhere. The corresponding author must declare that the manuscript is submitted on behalf of all authors.** Copyright belongs to the publisher upon acceptance of the manuscript. There is no page charge.
Authors investigating the chemistry of a single species should aim to publish their results in a single manuscript rather than in a series of papers. **Manuscripts that report fragmentary parts of a larger study will be returned to the authors at the Editor's discretion.**
Submission of a manuscript signifies acceptance of the journal's Guidelines for Authors.

3. Format of Manuscripts

Rapid Communications (up to 1,500 words, or 6 typewritten pages) are intended for the publication of exceptionally significant new and original results, such as unusual structures, bioactivities and innovative analytical techniques that deserve rapid publication. **Authors have to provide a justification statement with the manuscript, giving compelling reasons why it should be considered for rapid communication. The Editor will decide whether or not the work merits rapid publication.** Rapid Communications usually will be published in print 3–4 months after submission. Manuscripts should be written in the form of a Letter (see below) and must not exceed 15,000 characters including references. Emphasis should be given to the concise presentation of the results, but sufficient experimental data must be reported to allow other scientists in the field to reproduce the experiments. The number of references should not exceed 20. Authors are strongly encouraged to provide non-essential but useful data, figures and tables as Supporting Information (see below).

Papers (up to 3,000 words or 12 typewritten pages) are research articles describing original experimental results. The material should be arranged in the order: Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion sections. The Experimental Section should contain sufficient details so that others are able to reproduce the experiment(s). Previously reported methods should be referenced only. 4–6 Key words should be listed. Maximum length of Papers is 5,000 words or 30,000 characters including references. The number of references should not exceed 30. Authors are strongly encouraged to provide non-essential but useful data, figures and tables as Supporting Information (see below). In exceptional and well justified cases longer manuscripts may be accepted. When submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement, giving compelling reasons for the length of the paper.

Letters (up to 1,000 words or 4 typewritten pages) should be concise reports on new specific results of general interest. The Letter format contains a short Abstract; no keywords; introductory remarks and results and discussion without headlines; Material and Methods (headline) with brief experimental details without subheadlines; references. The number of references should not exceed 20. In case of spectroscopic work on known substances refer, if possible, to published data; the manuscript should then contain the following indication: *Copies of the original spectra are obtainable from the author of correspondence.* Authors are strongly encouraged to provide non-essential but useful data, figures and tables as Supporting Information (see below).

Reviews (typically up to 3,000 words or 12 typewritten pages) will generally be invited by the Editor. They should be as concise as possible and do not need to include experimental details. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in this area. 4–6 Key words should be listed.

Minireviews and **Perspectives** (typically up to 1500 words or 6 typewritten pages): Minireviews provide concise and critical

updates on a subject of high interest and will generally be invited by the Editor. Perspectives are written by leading experts in an emerging field and provide a concise assessment of the current state-of-the-art and an outlook on future developments. Perspectives will generally be invited by the Editor.

Editorials addressing topical issues of general interest to the readership of Planta Medica will be published on a irregular basis. They are written by the Editor-in-Chief, the Co-Editors, or by experts on a specific issue in the form of an Invited Editorial.

4. Preparation of Manuscripts

For submission of all manuscripts, follow the instructions of the online submission system. Before submission, keep ready full metadata of the manuscript (title, full names referenced by Arabic superscripts with affiliation and addresses of all authors, and also, the complete list of references, footnotes, figure legends, and tables). **The author submitting the manuscript will be corresponding author.**

The **Abstract** should contain brief information on purpose, methods, results and conclusion.

The **Introduction** should state the purpose of the investigation and relate to current knowledge in the specific topic addressed.

Material and Methods. Specific details about instrumentation and experimental protocols should be given here. Refer to literature if procols have been previously published.

Results and **Discussion** sections are only admitted in Full Papers and may appear as two separate parts or as a combined "Results and Discussion" section. Results should be presented in a concise manner. Tables and Figures should be presented in a manner which maximizes clarity and comprehension. Data of secondary importance for the understanding should be prepared as Supporting Information. The Discussion should provide an interpretation of the data and relate them to existing knowledge. Subtitles are only admitted in exceptional cases.

Acknowledgements should list persons who made minor contributions to the investigation and organizations providing support.

Supporting Information: Materials which are useful for readers but not quintessential for the understanding of the manuscript should be submitted here.

References should be numbered in the order in which they are cited in the text [1], [2], [3] … and the list of references should be arranged consecutively according to the numbers in text. Use Index Medicus abbreviations for journal titles. List the first six authors followed by et al. Authors bear complete responsibility for the accuracy of the references. The following examples illustrate the format for references:

[1] Trute A, Nahrstedt A. Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix*. Phytochem Anal 1996; 7: 204-8

[2] Mabberley DJ. The Plant-Book, 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1997. p. 520-1.

[3] Lechtenberg M, Nahrstedt A. Cyanogenic Glycosides. In: Ikan R, editor. Chichester: Wiley & Sons; 1999. p. 147-91.

If reference is made to papers submitted or in press, authors are requested to add a file of the manuscript or galley proof to the online submission. Avoid references to unpublished personal communications. For Papers a maximum of 30 references is suggested, and a maximum of 20 references for Rapid Communications and Letters. Recent review articles can substitute for all but the most pertinent original articles. The suggested maximal number of references for Full Papers, Rapid Communications and Letters are given above.

Tables and Figures must be referred to in the text by Arabic numerals. Provide each with a descriptive legend on separate pages for figures. Indicate footnote within tables by super script small letters, and type footnotes below the table. Submit illustrations (apparatus, spectra, chromatograms, X-ray crystal structures, etc.) as *.tif, *.jpg or *.wmf file (resolution: 300 dpi).
IR, NMR, mass, and UV spectra should be given in the manuscript as figures only if new relationships between molecular structures and spectroscopic properties are demonstrated or if new compounds are described where the listing of characteristic signals is not sufficient. Figures of chromatograms will only be accepted if they are essential for understanding the methods or the results described. We strongly encourage instead to present spectra and structural formula outlining NMR spectral correlations or MS fragmentation etc. as Supporting Information (see below).

Structural formulas should be prepared using ChemDraw® or similar programs. For printing they will be reduced to 70 % of their original size. Atomic symbols in formula: 10 point Arial; tables and names under formula: 10 point Arial; numbering of atoms: 7 point Arial; lettering on reaction arrow: 8 point Arial; compound numbers: 10 point Arial bold. Maximum widths of up to 12 cm for single column print and up to 25 cm for double column print; widths between 12,1 and ca. 15 cm should be avoided: Further information will be sent with the editorial letter after evaluation of the manuscript.

X-Ray Crystallographic Data must include a line drawing of the structure, a perspective drawing, and a discussion of bond lengths and angles. A supplement describing full details of the structure and methods and means of its determination in a form suitable for deposition must be submitted with the Fachinformationszentrum Energie, Physik, Mathematik, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, or a similar information storage centre. The manuscript must state at which storage centre the data have been deposited.

Abbreviations should generally be used sparingly. Standard abbreviations such as mp, bp, K, s, min, h, µl, ml, µg, mg, g, kg, nm, mm, cm, ppm, mmol, HPLC, TLC, GC, UV, CD, IR, MS, NMR can be used throughout the manuscript. Non-standard abbreviations must be defined in the text following their first use. Provide a list of all non-standard abbreviations on a separate page. Define all symbols used in equations and formulas. If symbols are used extensively, provide a list of all symbols together with the list of abbreviations.

Documentation of Plants and Plant Materials: Use the correct botanical nomenclature following the Index Kewensis, The Plant-Book (Mabberley DJ, 2nd edition; ISBN 052144210) and/or the International

Guidelines for Authors

code of botanical Nomenclature (www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/tokyo-e/default.htm). Give the plant name (underlined or in italic), the author of this name and the plant family. Indicate who identified the plant material. The manuscript must include references to voucher specimens of the plants or the material examined including their registration number(s). Such specimens should be deposited in a major regional herbarium which permits loan of such material.

Chemical Nomenclature used should be based on the systematic rules adopted by Chemical Abstracts (Index Guide Vol. 76), Ring Index and Supplements (American Chemical Society, 1959-1965), IUPAC (Nomenclature of Organic Chemistry, Parts A, B & C, Pergamon Press, 1979) etc. Trivial names should be avoided unless they are definitely advantageous over the corresponding systematic names. For reference drug substances the INN names should be used.

Description of the Isolation of Compounds: The kind and amount of material, solvents and extraction methods must be indicated. The description of chromatographic systems should contain the quantitative information that allows the reader to repeat the work, e.g.: "MPLC on silica gel (2 × 50 cm), MeOH/ EtOAc 8:2, 3 ml/min; t_R of **1**: 60–70 ml, **2**: 120–140 ml, **3**: 145–175 ml; detection of eluates by TLC (SiO_2, MeOH/H_2O 9:1; Dragendorff reagent), Rf **1**: 0.35, **2**: 0.55, **3**: 0.73"). When using gradients the volumes of solvents should be presented; fractions should be defin ed by their elution volume. Similar information is necessary for HPLC, GLC, DCCC, MLCC and all other methods of purification. Please refer to the template as an example for appropriate presentation.
GC identifications of constituents of essential oils must be supported by retention indices on a polar and an apolar column. Identification by GC-MS is preferred.

Physico-chemical Characterization of Compounds: Data provided for new compounds should enable an unambiguous identification of the substance and have to appear in the following order: visual appearance, chromatographic mobility in TLC, GC, or HPLC, mp, UV-vis, CD, IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, low resolution MS, high resolution MS, elemental analysis. Follow the presentation style of the template accurately (see templates).

Analytical studies: Key data on method validation must be provided and should typically include information on specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy, precision, intermediate precision, and some robustness studies. Information on the purity of reference compounds, and on the methods used for the determination of purity must be given. Recoveries of extraction and sample pre-purification steps have to be indicated. Adequate statistical treatment of data is required. For more information regarding validation issues, prospective authors should also refer to ICH guidelines.

Supporting Information: To keep articles as concise and at the same time as informative as possible, authors are strongly encouraged to submit part of their tables and figures as Supporting Information. The following type of data will be preferentially published as Supporting Information rather than in the print article: High-resolution halftone and colour illustrations, spectra, chromatograms, structural drawings outlining NMR correlations, experimental procedures of secondary importance, tables summarizing data that are non-quintessential but useful to the understanding of an article.
The cover page for Supporting Information must contain the title of the manuscript, and names and affiliations of authors. Legends for Figures and Tables must appear directly on the respective figure pages. Pages have to be numbered consecutively. Supporting Information is published on the journal's homepage at http://www.thieme.de/plantamedica.

5. General Information

Pharmacological Investigations

PLANTA MEDICA will only consider manuscripts in which conclusions are based on adequate statistics which account for the type of data distribution, on the number of experimental observations required for the application of the respective statistical method, and which incorporate the appropriate tests of significance. **In each case positive controls (reference compounds) should be used** and the dose/dependence should be shown.
When working with experimental animals, reference should be made to principles of laboratory animal care or similar regulations.
Pharmacological investigations of extracts require detailed extract characterisation. This includes botanical characterisation of plant material, solvent(s), duration and temperature of extraction, plus other method(s) used for preparation(s). The drug to extract ratio (DER) must be given. A chromatographic (e.g. HPLC profile recorded at different wavelengths) or chemical characterisation (quantities of typical constituents) has to be presented; altogether the phytochemical standardisation of an extract and/or fraction(s) require state of the art methods. The investigation must clearly indicate a dose/activity dependence in comparison to a reference compound (positive control) together with the appropriate statistics.

Clinical Studies

Studies reporting on plant preparation tested in humans will be accepted for review and publication. Clinical studies must be designed, implemented and analyzed in a manner to meet current standards of randomized controlled trials. For guidelines see the following reviews: Begg C et al. JAMA 1996; 276: 637–9 and Altmann DG: BMJ 1996; 313: 570–1. All methods and variables used in a trial should be described; the data must be based on adequate statistics. Herbal medicinal products used must be characterized as described above under "pharmacological investigations with extracts".

Proofs and Reprints

Galley proofs will be sent to the corresponding author as a PDF file. 25 reprints of each article will be supplied free of charge. These will be shipped after publication of the journal issue. An order form for further reprints (in increments of 50) will be sent with the galley proofs and should be signed and returned with the corrected proofs even if additional reprints are not requested.

© 2004 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York. All rights reserved.

Guidelines for Authors