



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

CAIO CÉSAR DE ANDRADE RODRIGUES SILVA

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE EXTRATO SECO
PADRONIZADO À BASE DA ESPÉCIE VEGETAL *Thuja occidentalis* Linn.**

Recife
2015

CAIO CÉSAR DE ANDRADE RODRIGUES SILVA

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE EXTRATO SECO
PADRONIZADO À BASE DA ESPÉCIE VEGETAL *Thuja occidentalis* Linn.**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife
2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Caio César de Andrade Rodrigues
Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* Linn./ Caio César de Andrade Rodrigues Silva- Recife: O Autor, 2015.

188 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Pedro José Rolim Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia e apêndice

- 1. Matéria médica vegetal 2. Thuja occidentalis 3. Polissacarídeos I. Rolim Neto, Pedro José (orientador) II. Título**

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-127

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

CAIO CÉSAR DE ANDRADE RODRIGUES SILVA

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE EXTRATO SECO
PADRONIZADO À BASE DA ESPÉCIE VEGETAL *Thuja occidentalis* Linn.**

Dissertação de Mestrado de Caio César
de Andrade Rodrigues Silva, defendida e
APROVADA em ____ de _____ de
2015, e cuja Banca Examinadora foi
constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Assinatura: _____

Tudo posso naquele que me fortalece (Filipenses 4:13).

AGRADECIMENTOS

Ao **SENHOR JESUS CRISTO**, meu único **DEUS, Salvador e Redentor**, pela proteção, carinho e amor que sempre tem demonstrado para comigo, pobre pecador. Por ter me encaminhado até este momento e conduzido meus caminhos, pois sempre soube o que era melhor para mim. Pela Sua infinita providência, por colocar pessoas especiais em meu caminho, que de forma direta ou indireta me apoiaram e ajudaram para que este sonho viesse a tornar-se realidade.

À **Universidade Federal de Pernambuco** e ao **Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**, e as pessoas que o compõem, em especial ao **Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade**, por motivar todos os alunos que ingressam neste querido programa e que faz questão de ter conhecimento acerca de nossos projetos e objetivos. E ao atencioso **Paulo Germano** pelo profissionalismo e gentileza, prestados para comigo.

Ao meu competente orientador, **Prof. Dr. Pedro Rolim**, por ter acreditado em mim, mesmo não tendo sido graduado pela UFPE e sim, pela UNINASSAU, ainda assim, me aceitou para fazer parte de seu magnífico laboratório, **Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM**, onde tive a oportunidade de aprender e amadurecer em minha carreira profissional. Agradeço também ao **Prof. Pedro** pelas repreensões recebidas, pois creio e é notório, que ele cuida como um pai dos seus alunos e por isso exige quando é necessário e nos elogia, de forma pública, quando merecemos. Meu sincero, MUITO OBRIGADO!!!

À minha grande amiga **Graziella Silvestre Marques** que é, sem sobra de dúvidas, a grande motivadora deste projeto. Por seu apoio, profissionalismo, análise crítica, em fim, pela sorte que eu tenho em ter você como doutoranda nesse projeto. **Grazi**, não tenho palavras para te agradecer. OBRIGADO!!!

Ao **Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT**, pelo apoio. Em especial a Thiago Lins e Priscilla Stella, pela paciência e companheirismo.

À minha família em especial aos meus pais, **João Rodrigues e Idenise Andrade**, por acreditarem em mim e sempre mencionar meu nome com orgulho, muito obrigado. De igual modo aos meus irmãos, **Cristóvão Wollieson e Cahú**

Victor, que mesmo sendo tão diferentes, ainda continuamos unidos como uma verdadeira família.

À minha amada noiva, **Aline Fernanda**, por seu amor e consideração. Pelo incentivo e preocupação para comigo. Minha princesa, eu te amo. Obrigado!

À equipe que compõe o projeto *Thuja*, como também aos que já fizeram parte, **Graziella Marques, Lariza Darlene, Williana Tôrres, Carlos Alberto, Rosali Maria, Camila Figueirêdo**.

Aos amigos **José Lourenço de Freitas Neto e Danilo Augusto Ferreira Fontes**, pelos conselhos e companheirismo.

À família de profissão e pesquisa LTM: **Leslie Raphael, Isabela Amariz, Pablo Ataíde, Larissa Rolim, Cristovão Rodrigues, Salvana Priscylla, Larissa Morgana, Magaly Lyra, Fabiana Lícia, Aline Élide, Lidiany Siqueira, Ricardo Tadeu, Talita Atanazio e Débora Dolores**.

Ao **Laboratório de Farmacognosia** em especial, a **Magda Assunção, Marcos Galvão, Julia Souza e Isabelle Ferraz**, pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Ao **Laboratório de Produtos Naturais – Lapronat**, pelo auxílio na utilização de equipamentos.

Ao **Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos – NCQMC**, e simpática **Maria do Rosário** por todo apoio prestado.

Ao **CETENE** por todo suporte tecnológico disponibilizado.

A todos que apoiaram de forma de direta e indireta para o desenvolvimento desse trabalho.

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE)** que, através do programa institucional de bolsas de Pós-graduação, contribuiu a realização desse trabalho.

Obrigado a todos!!

RESUMO

Há alguns anos, tem-se crescente interesse pela obtenção de agentes terapêuticos com potencial imunoestimulante e antioxidante, capazes de ser utilizados no tratamento de doenças, como a espécie *T. occidentalis*. Dessa forma, este trabalho teve como propósito obter e avaliar a atividade farmacológica do extrato seco padronizado de *Thuja occidentalis* Linn. Para este fim, procedeu-se com a validação do método para doseamento de polissacarídeos, em seguida, realizou-se a otimização da extração. A partir do método validado e otimizado, obteve-se a solução extrativa rica em polissacarídeos, como também o extrato seco e fração polissacarídica. Além disso, avaliou-se a composição de monossacarídeos presentes no extrato seco e fração de polissacarídeos. Adicionalmente, foi avaliada a atividade imunoestimulante do extrato e fração, através da determinação da expressão de Interferon-gama (INF- γ) e Interleucinas (ILs) 6, 10, 17 e 22 em esplenócitos de camundongos e de INF γ e ILs 2, 4, 6 e 1 β em PBMCs humanas. Do mesmo modo, avaliou-se a atividade antioxidante do extrato e fração de polissacarídeos através de testes *in vitro* pelo sequestro dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH $^{\bullet}$), 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazoline-6-sulfônico) (ABTS $^{\bullet+}$), hidroxila (OH $^{\bullet}$) e óxido nítrico (NO). Para o doseamento, foi aplicado o método de antrona. Pelos testes de fator-único, foram selecionadas as melhores condições de temperatura (85-95°C), tempo (4,0-5,0 h) de extração e proporção de droga vegetal:água (4 g: 30 mL). Os efeitos da temperatura e tempo sobre o teor de polissacarídeos foram estudados pelo planejamento fatorial. Os resultados demonstraram que o aumento simultâneo desses parâmetros ocasionou redução do teor dos polissacarídeos, de modo que as condições ótimas para obtenção da solução extrativa foram: temperatura de 95°C e tempo de 4 h. O extrato seco obtido mostrou-se como pó fino, higroscópico e com baixa capacidade de fluxo, demonstrando a necessidade da adição de excipientes que viabilizem sua utilização farmacêutica. A análise da composição dos monossacarídeos extrato e fração revelou a presença predominante, de glicose (extrato) e manose (fração). A avaliação da atividade imunoestimulante demonstrou que houve estímulo das citocinas: 6 e 1 β . Além de viabilidade celular superior a 90%. Na avaliação antioxidante todos os testes demonstraram o potencial antioxidante superior do extrato em relação a fração.

Palavras-chave: Extratos. *Thuja occidentalis*. Polissacarídeos. Antioxidantes. Terapia imunoestimulante.

ABSTRACT

For some years, increasing interest has been the achievement of therapeutic agents with immunostimulatory and antioxidant potential, able to be used in the treatment of diseases such as *T. occidentalis* species. Thus, this study aimed to obtain and evaluate the pharmacological activity standardized dry extract of *Thuja occidentalis* Linn. To this end, it proceeded with the validation method for determination of polysaccharides, and then extraction was performed optimization. From the validated and optimized method, we obtained the rich extraction solution in polysaccharides, as well as the dried extract and polysaccharide fraction. In addition, we evaluated the composition of monosaccharides present in the dry extract and fraction of polysaccharides. Additionally, the immunostimulatory activity of the extract and fraction was evaluated by determining the expression of interferon-gamma (IFN- γ) and interleukins (ILs) 6, 10, 17 and 22 in splenocytes of mice and INF γ and ILs 2, 4 6 and 1 β in human PBMC. Likewise, we evaluated the antioxidant activity of the extract and polysaccharides fraction through in vitro tests for the kidnapping of radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH $\bullet$), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS $\bullet$ +), hydroxyl (OH $\bullet$) and nitric oxide (NO). For the assay, it applied the anthrone method. For single-factor tests, the best temperature conditions were selected (85-95 °C) time (4.0-5.0 h) extraction and proportion of vegetable drugs: water (4 g: 30 mL). The effects of temperature and time on polysaccharide content were studied by factorial design. The results demonstrated that the simultaneous increase in these parameters caused reduction of the content of the polysaccharide, so that the optimum conditions for obtaining the extraction solution were: temperature 95 °C and time 4 h. The dry extract obtained proved to be a fine powder, hygroscopic and with low flow capacity, demonstrating the need for the addition of excipients that enable its pharmaceutical use. The analysis of the composition of the extract and monosaccharide fraction revealed the predominant presence of glucose (extract) and mannose (fraction). The evaluation of the immunostimulant activity showed that there was stimulation of cytokines: 6 and 1 β . In addition to greater than 90% cell viability. In assessing antioxidant all tests have demonstrated the superior antioxidant potential of the extract compared to fraction.

Keywords: *Thuja occidentalis*. Extracts. Polysaccharides. Antioxidants. Immunostimulant therapy.

Lista de figuras

Figura 1 - Reação de complexação da antrona com carboidratos.....	62
Figura 2 - Estrutura molecular radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH*	68
Figura 3 - Reação do método de determinação de TBARS entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído (MDA).....	71
Figura 4 - Mecanismo de reação do método de Griess.....	72
Figura 5 - Método geral para obtenção da solução-teste e doseamento dos polissacarídeos totais (Método de antrona).....	77
Figura 6 - Espectros de varredura obtidos na análise de especificidade do método de antrona para determinação dos polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	105
Figura 7 - Efeito de diferentes temperaturas sobre a extração dos polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	109
Figura 8 - Efeito de diferentes tempos sobre a extração dos polissacarídeos totais de <i>T. occidentalis</i>	110
Figura 9 - Efeito de diferentes proporções de droga vegetal sobre o a extração dos polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	111
Figura 10: Efeito de diferentes proporções de droga vegetal sobre a extração dos polissacarídeos, considerando o peso seco de <i>T. occidentalis</i>	112
Figura 11 - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados obtido pelo planejamento fatorial 32, tendo como fatores a temperatura e o tempo de extração e, como variável resposta o teor de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	114
Figura 12 - Gráfico de Superfície Resposta obtido pelo planejamento fatorial 32, tendo como fatores a temperatura e o tempo de extração e, como variável resposta o teor de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	116
Figura 13 - Aspecto macroscópicos do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	119
Figura 14 - Fotomicrografia, por microscopia eletrônica de varredura, do extrato seco de <i>T. occidentalis</i> , sob aumento de 100 (A), 600 (B) e 1600 vezes (C).....	119
Figura 15 - Distribuição do tamanho de partículas do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	121
Figura 16 - Espectro de infravermelho do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	122
Figura 17 - Curvas de TG e DTG do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	123
Figura 18 - Perfil de higroscopicidade do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	125
Figura 19 - Aspecto macroscópico da fração polissacarídica liofilizada de <i>T. occidentalis</i> ..	128
Figura 20 - Avaliação da citotoxicidade em cultura de PBMCs após exposição ao extrato seco de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	130
Figura 21 - Avaliação da citotoxicidade em cultura de PBMCs após exposição a fração polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	131
Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos de BALBs após pré-tratamento com extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	132
Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos de BALBs após pré-tratamento com fração polissacarídica de <i>T. occidentalis</i>	133
Figura 24 - Determinação de IL-6 em cultura de esplenócitos de BALB após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	135
Figura 25 - Determinação de IL-17A em cultura de esplenócitos de BALB após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	136
Figura 26 - Determinação de IL-22 em cultura de esplenócitos de BALB após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	137

Figura 27 - Determinação de IL-10 em cultura de esplenócitos de BALB após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	138
Figura 28 - Determinação de IL-2 e INF- γ em cultura PBMCs após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	140
Figura 29 - Determinação de IL-1 β e IL-6 em cultura PBMCs após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	141

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Parâmetros de extração de polissacarídeos de plantas medicinais.....	60
Tabela 2 -	Obtenção da curva padrão de glicose para determinação do teor de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	78
Tabela 3 -	Níveis das variáveis do planejamento fatorial 3 ²	82
Tabela 4 -	Interpretação do Índice de Carr (IC) para a fluidez de pós (WELLS, apud ANDRADE, 2009).....	90
Tabela 5 -	Robustez do método de antrona para determinação dos polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	106
Tabela 6 -	Precisão intermediária do método de antrona para determinação dos polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	107
Tabela 7 -	Teste de recuperação do método de antrona para determinação dos polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	107
Tabela 8 -	Matriz do planejamento experimental 3 ² para avaliação das variáveis influentes na extração de polissacarídeos de <i>T. occidentalis</i>	113
Tabela 9 -	Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta obtido a partir do planejamento fatorial 3 ²	117
Tabela 10 -	Caracterização da solução extrativa de <i>T. occidentalis</i>	118
Tabela 11 -	Propriedade de compactação do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	126
Tabela 12 -	Teor de monossacarídeos do extrato seco e fração polissacarídica de <i>T. occidenalis</i>	129
Tabela 13 -	Potencial antioxidante <i>in vitro</i> do extrato seco e fração polissacarídica de <i>T. occidentalis</i> no sequestro do radical DPPH•	143
Tabela 14 -	Potencial antioxidante <i>in vitro</i> do extrato seco e fração polissacarídica de <i>T. occidentalis</i> no sequestro do radical	145

ABTS•+.....

Tabela 15 -	Potencial antioxidante <i>in vitro</i> e do extrato seco e fração polissacarídica de <i>T. occidentalis</i> na inibição da peroxidação Lipídica pela diminuição dos níveis de TBARS.....	146
Tabela 16 -	Potencial antioxidante <i>in vitro</i> do extrato seco e fração polissacarídica de <i>T. occidentalis</i> no sequestro do radical OH•....	148
Tabela 17 -	Potencial antioxidante <i>in vitro</i> do extrato seco e fração polissacarídica de <i>T. occidentalis</i> no sequestro do NO.....	150

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais mecanismos de ação relacionados a atividade imunoestimulante dos derivados vegetais.....	48
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	Dihidrocloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropinamida
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico
ABTS•+	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato
ADCC	Citotoxicidade dependente de anticorpo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CCL2	Quimiocina ligante 2
CCL3	Quimiocina ligante 3
CCL5	Quimiocina ligante 5
CDC	Citotoxicidade dependente do complemento
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CG	Cromatografia gasosa
CHCl ₃	Clorofórmio
COX-2	Cicloxigenase-2
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
CV%	Coeficiente de variação percentual
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dp	Desvio padrão
DP _a	Desvio padrão do intercepto com o eixo Y
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Elisa	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FT-IR	Infravermelho por Transformada de Fourier
gl	Graus de liberdade
GM-CSF	Fator de estimulação de colônias granulócitos e macrófagos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papiloma vírus humano
IC	Média dos coeficientes angulares (inclinação da reta)
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IFN	Interferon
IFN-α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon gama

IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
L	Interação linear
LD	Limite de detecção
Linfócitos CD4+	Linfócitos T auxiliares
Linfócitos CD8+	Linfócitos T citotóxicos
LQ	Limite de quantificação
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein-1-alpha</i>
MS	Média dos quadrados
MTT	Método 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NF- κ B p52	Fator nuclear kappa beta p52
NF- κ B	Fator Nuclear kappa beta
NF- κ B p50	Fator Nuclear kappa beta p50
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NO $_2^-$	Nitrito
NPS	Nitroprussiato de sódio
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PLS	Polissacarídeo
PTN	Proteína

Q	Interação quadrática
R ²	Coeficiente de determinação
RANTES	<i>Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SS	Soma dos quadrados
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoracético
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TP	Teor de polissacarídeos
Trolox [®]	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico
UV/Vis	Ultravioleta/visível

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1	<i>Thuja occidentalis</i> LINN.....	27
3.1.1	Aspectos botânicos.....	27
3.1.2	Propriedades farmacológicas.....	28
3.1.3	Perfil fitoquímico.....	29
3.1.4	Aspectos toxicológicos.....	30
3.2	DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS.....	31
3.3	SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	33
3.4	IMUNODEFICIÊNCIAS.....	35
3.4.1	Imunodeficiências primárias.....	35
3.4.2	Imunodeficiências secundárias.....	36
3.4.2.1	Desnutrição.....	37
3.4.2.2	Infecções.....	38
3.4.2.3	Medicamentos.....	39
3.4.2.4	Doenças neoplásicas.....	39
3.4.2.5	Cirurgia e traumatologia.....	40
3.4.2.6	Doenças metabólicas.....	41
3.4.2.7	Outras condições.....	41
3.5	TERAPIA IMUNOESTIMULANTE.....	43
3.5.1	Plantas medicinais com atividade imunoestimulante.....	45
3.5.2	Compostos vegetais com atividade imunoestimulante.....	49
3.5.2.1	Polissacarídeos.....	50
3.5.2.2	Polifenóis.....	56
3.5.2.3	Outros grupos de metabólitos.....	57
3.6	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	59
3.7	DOSEAMENTO DE POLISSACARÍDEOS.....	61
3.8	RADICAIS LIVRES E IMPLICAÇÕES PATOLÓGICAS.....	63
3.9	ANTIOXIDANTES.....	65
3.10	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	67
3.10.1	Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH [•]).....	67
3.10.2	Sequestro do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS ^{•+}).....	69
3.10.3	Inibição da peroxidação lipídica – Método de determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	70
3.10.4	Sequestro do radical OH [•] – Ensaio da desoxirribose.....	71
3.10.5	Sequestro do NO.....	72
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.1	MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	74
4.1.1	Obtenção da droga vegetal (estabilização, secagem e pulverização).....	74
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE POLISSACARÍDEOS TOTAIS DAS PARTES AÉREAS DE <i>T. occidentalis</i>	74

4.2.1	Matérias-primas.....	75
4.2.2	Reagente da antrona.....	75
4.2.3	Obtenção da solução extrativa.....	75
4.2.4	Método geral para obtenção de solução aquosa de polissacarídeos (solução-teste).....	75
4.2.5	Método geral para doseamento dos polissacarídeos totais (método de antrona).....	78
4.2.6	Validação do método analítico.....	78
4.2.6.1	Especificidade.....	79
4.2.6.2	Linearidade, limites de detecção e quantificação.....	79
4.2.6.3	Robustez.....	80
4.2.6.4	Precisão.....	80
4.2.6.5	Exatidão.....	80
4.3	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS TOTAIS DAS PARTES AÉREAS DE <i>T. occidentalis</i>	81
4.3.1	Matérias-primas.....	81
4.3.2	Reagentes de antrona.....	81
4.3.3	Obtenção da solução extrativa.....	81
4.3.4	Experimento de fator-único.....	82
4.3.5	Metodologia de superfície resposta – planejamento fatorial 3 ²	82
4.3.6	Determinação de teor de polissacarídeos totais.....	82
4.3.7	Análise estatística.....	83
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA DE <i>T. occidentalis</i>	84
4.4.1	Obtenção da solução extrativa de <i>T. occidentalis</i>	84
4.4.2	Caracterização da solução extrativa de <i>T. occidentalis</i>	84
4.4.2.1	Determinação do pH.....	84
4.4.2.2	Determinação da densidade relativa.....	84
4.4.2.3	Determinação de resíduo seco.....	85
4.4.2.4	Determinação de polissacarídeos totais.....	85
4.5	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE <i>T. occidentalis</i>	85
4.5.1	Obtenção do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	85
4.5.2	Caracterização do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	86
4.5.2.1	Descrição macroscópica.....	86
4.5.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	86
4.5.2.3	Determinação de pH.....	86
4.5.2.4	Determinação do tamanho de partícula por granulometria a laser.....	86
4.5.2.5	Espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IV).....	87
4.5.2.6	Caracterização térmica.....	87
4.5.2.7	Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco.....	87
4.5.2.8	Determinação da higroscopicidade.....	88
4.5.2.9	Determinação de polissacarídeos totais.....	89
4.5.2.10	Avaliação das propriedades de compactação.....	89
4.5.2.11	Avaliação do ângulo de repouso e tempo de escoamento.....	90
4.6	OBTENÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>T. occidentalis</i>	90
4.7	ANÁLISE QUALITATIVA DA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>T. occidentalis</i>	91
4.7.1	Preparação de amostras.....	91
4.7.2	Análise em CG-MS.....	92

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULANTE DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>T. occidentalis</i>	92
4.8.1 Amostras	92
4.8.1.1 Estudo experimental com camundongos BALB/c.....	92
4.8.1.2 Estudo experimental com PBMCs.....	93
4.8.2 Processamento das amostras	93
4.8.2.1 Preparação dos esplenócitos.....	93
4.8.2.2 Preparação dos PBMCs.....	94
4.8.3 Avaliação de citotoxicidade	94
4.8.3.1 Avaliação de citotoxicidade.....	94
4.8.4 Cultura celular	95
4.8.5 Doseamento de citocinas	95
4.8.6 Tratamento estatístico	96
4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>T. occidentalis</i>	96
4.9.1 Sequestro do radical DPPH[•]	97
4.9.2 Sequestro do radical (ABTS^{•+})	98
4.9.3 Inibição da peroxidação lipídica – Método de determinação de TBARS	99
4.9.4 Sequestro do radical OH[•]	100
4.9.5 Sequestro do NO	101
4.9.6 Análise estatística	102
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
5.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL (<i>T. occidentalis</i>).....	104
5.1.1 Obtenção da droga vegetal (estabilização, secagem e pulverização)	104
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE POLISSACARÍDEOS TOTAIS DAS PARTES AÉREAS DE <i>T. occidentalis</i>	104
5.2.1 Validação do método analítico	104
5.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DAS PARTES AÉREAS DE <i>T. occidentalis</i>	108
5.3.1 Experimento de fator-único	108
5.3.2 Metodologia de Superfície de resposta- planejamento fatorial 3²	112
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA DE <i>T. occidentalis</i>	118
5.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE <i>T. occidentalis</i>	118
5.5.1 Descrição macroscópica	118
5.5.2 Análise em MEV	119
5.5.3 Determinação de pH	120
5.5.4 Determinação do tamanho de partícula por granulometria a laser	120
5.5.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IV)	121
5.5.6 Caracterização térmica	122
5.5.7 Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco	123
5.5.8 Determinação da higroscopicidade	124
5.5.9 Determinação de polissacarídeos totais	126
5.5.10 Propriedades de compactação, ângulo repouso e tempo de escoamento	126
5.6 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>T. occidentalis</i>	127
5.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>T. occidentalis</i>	128
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULANTE DO EXTRATO SECO E	

FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>T. occidentalis</i>	129
5.8.1 Avaliação de citotoxicidade	129
5.8.2 Determinação de citocinas	133
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO E	
FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>T. occidentalis</i>	143
5.1.1 Sequestro do radical DPPH[•]	143
5.1.2 Sequestro do radical ABTS^{•+}	144
5.1.3 Inibição da peroxidação lipídica – Método de determinação de TBARS	146
5.1.4 Sequestro do radical OH[•]	147
5.1.5 Sequestro do NO	149
6 CONCLUSÃO	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	185

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As imunodeficiências compõem um grupo diverso de doenças resultantes de uma ou mais anormalidades do sistema imune, sendo classificadas como primárias ou congênitas, quando as desordens são de origem genética, e secundárias ou adquiridas, quando advêm de uma causa externa ao sistema imunológico, através da exposição a uma variedade de fatores, dentre os quais se destaca a desnutrição como causa mais prevalente, e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), como a causa conhecida no mundo (DORNAS et al., 2010). Vale ressaltar ainda que o sistema imunológico possui relação direta com processos carcinogênicos, de modo que semelhante aos processos infecciosos, as imunodeficiências podem ser a causa ou a consequência de uma doença neoplásica (SUCHKOV et al., 2007).

Portanto, os agentes imunoestimulantes têm constituído uma importante terapia para prevenção e tratamento das diversas condições patológicas associadas à deficiência imunológica (BENMEBAREK et al., 2013). Neste sentido, a imunomodulação conferida por plantas medicinais e seus derivados têm sido alvo de avaliação há muitos anos; e no cenário atual permanece como um importante foco de pesquisa, de modo que vários extratos, compostos e formulações tem sido patenteados, demonstrando o grande potencial existente para a descoberta de agentes imunomoduladores de origem natural (ALAMGIR; UDDIN, 2010). Dentre as espécies vegetais de amplo interesse medicinal pela propriedade fortalecedora do sistema imune, destaca-se *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae), popularmente conhecida como árvore da vida ou cedro branco, e cujas principais aplicações têm sido atribuídas as suas propriedades antiviral, imunoestimulante e antimetastásica (NASER et al., 2005a; SUNILA; HAMSA; KUTTAN, 2011); sendo ainda uma das espécies que compõem o Esberitox® N, um fitoterápico produzido pela *Aspen Pharmacare Australia* e clinicamente comprovado para fortalecimento do sistema imunológico e tratamento de sintomas do resfriado comum (ESBERITOX® N, 2013).

Os fitoterápicos podem ser desenvolvidos e comercializados em diferentes formas farmacêuticas sejam elas líquidas, sólidas ou semissólidas, no entanto

destaca-se o interesse da Indústria Farmacêutica pelas formas sólidas, devido às vantagens que apresentam no que diz respeito à estabilidade físico-química e microbiológica, precisão de dosagem, boa aceitação pela população, facilidade de manuseio, transporte e armazenamento (DA SILVA, 2011). Contudo seu desenvolvimento e produção em larga escala através de processos bem estabelecidos e robustos geralmente requer o emprego de extratos secos vegetais como produtos intermediários (DA SILVA, 2011; SILVA et al., 2012). Os extratos secos são obtidos pela desidratação das soluções extrativas através de técnicas como a nebulização (*spray-dryer*), o leito de jorro, a liofilização e a evaporação rotativa (SILVA et al., 2012). O intuito deste processo é propiciar maior homogeneidade dos constituintes químicos (SILVA, 2006), maior estabilidade físico-química e microbiológica, maior facilidade de padronização e melhores características tecnológicas em relação à droga vegetal (SILVA, 2006; SILVA et al., 2012).

No entanto, estes produtos obtidos geralmente são higroscópicos e apresentam deficientes propriedades reológicas e mecânicas que os tornam inaptos ao processo de compressão, motivo pelo qual os fitoterápicos têm sido comercializados preponderantemente como cápsulas, mesmo diante da preferência da indústria farmacêutica pelos comprimidos.

Diante deste contexto, e levando em consideração que o Esberitox® N não encontra-se disponível no Brasil e que ainda não existem fitoterápicos registrados para uso oral contendo apenas a *T. occidentalis* como componente ativo, este trabalho tem como objetivo obter extrato seco, à base da espécie medicinal *Thuja occidentalis*, visando propiciar o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas antioxidantes.

2. Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e avaliar a atividade farmacológica do extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* Linn.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar método para obtenção e padronização de solução extrativa e fração polissacarídica à base de *T. occidentalis*;
- Obter e caracterizar o extrato seco a partir de *T. occidentalis*;
- Analisar a composição de monossacarídeos presentes no extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* por Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/MS);
- Avaliar a atividade imunoestimulante de *T. occidentalis*;
- Avaliar por diferentes metodologias a atividade antioxidante do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis*.

3. Revisão Bibliográfica

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Thuja occidentalis* LINN.

Thuja occidentalis, comumente conhecida como árvore da vida ou cedro branco, é uma árvore pertencente ao gênero *Thuja* e família Cupressaceae (CHANG et al., 2000). Originária do leste da América do Norte e cultivada no Brasil como árvore ornamental (CHANG et al., 2000), esta espécie foi identificada pela primeira vez, durante uma expedição do século 16 no Canadá, onde era utilizada como remédio por índios nativos, tendo demonstrado eficácia no tratamento de fraqueza e escorbuto (NASER et al., 2005b). A seguir serão discutidos alguns aspectos importantes sobre essa espécie.

3.1.1 Aspectos botânicos

As árvores de *T. occidentalis* têm característica conífera e monoica, medindo 12-21 m de altura (HEBER, 2007; NASER et al., 2005a), com caule ereto do tipo tronco com córtex marrom-avermelhado e galhos bastante ramificados (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011). Os ramos são achatados, curtos, horizontais, de extremidade ascendente e cobertos com pequenas folhas rígidas, imbricadas umas às outras. As folhas são ovais, persistentes, verdes, parecidas com escamas cruzadas de forma oposta e com extremidades acuminadas sobre uma superfície dorsal convexa (HEBER, 2007; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011). Na extremidade dos ramos ocorrem também cones ovoides pequenos (6-8 mm de comprimento), microesporofilados, de cor amarelo-esverdeado e cobertos de coriáceas amarelos (HEBER, 2007; FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011). Estes cones são formados por 8 ou mais escamas, com 1-3 óvulos cada um (STANGERLIN et al., 2008). As flores apresentam-se em cones separados (monoicas), compostas por flores

masculinas (cor marrom-escuro) e flores femininas (cor amarelo-esverdeada), que tem quase o formato de estrela. As sementes são marrom-amareladas, têm 3-5 mm de comprimento e aproximadamente 1 mm de largura (HEBER, 2007). O fruto é cone megasporofilado estróbilo oblongo subcônico, verde-castanho (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011).

Esta espécie demonstra grande tolerância à disponibilidade de água, podendo ser encontrada em habitats diversos, variando de seco a superfícies pantanosas. Há evidências de que *T. occidentalis* exibe ajustamento osmótico em resposta ao déficit hídrico. Esta resposta ao ajuste osmótico é comum frente ao déficit hídrico em algumas herbáceas e espécies de plantas lenhosas (EDWARDS & DIXON, 1995).

Em relação ao seu cultivo, com base em visitas técnicas realizadas em viveiros e pequenos produtores rurais de quatro municípios do Rio Grande do Sul (Brasil), foi constatada a preferência de multiplicação de *T. occidentalis* por estacas, com escolha de árvores sadias para o fornecimento de galhos, e cultivadas a campo, onde permanecem por 2 a 4 anos para então serem transplantadas para vasos e vendidas. O custo total médio da muda propagada por estaquia é de R\$ 2,79 (STANGERLIN et al., 2008).

Com relação aos fatores que afetam a regeneração de *T. occidentalis*, Larouche (2009) constatou que o seu crescimento das árvores em altura é influenciado pela região e disponibilidade de luz, enquanto o seu crescimento diametral está relacionado com o corte parcial, sendo preferível o corte parcial de baixa intensidade ou o trabalho com regeneração natural. Posteriormente, o estudo descrito por Larouche, Ruel & Lussier (2011) confirma com os resultados anteriores apontando, inclusive, que o crescimento inicial de mudas plantadas e a produção de biomassa foram proporcionais à disponibilidade de luz.

3.1.2 Propriedades farmacológicas

Diversas atividades farmacológicas da espécie *T. occidentalis* encontram-se descritas na literatura, dentre as quais pode-se citar as atividades antiviral (GOHLA

et al., 1992; BODINET et al., 2002); hepatoprotectora (DUBEY; BATRA, 2008b); antidiabética (DUBEY; BATRA, 2008a); antioxidante (DUBEY; BATRA, 2009b); anti-ulcerativa (DUBEY; BATRA, 2009c); anti-aterosclerótica (DUBEY; BATRA, 2009a); antimicrobiana (TSIRI et al., 2009); e antitumoral (SUNILA & HAMSA, 2006; SUNILA; HAMSA; KUTTAN, 2011).

Seu emprego na forma de tinturas-mãe hidroalcoólicas ou diluídas, vêm sendo largamente utilizado na homeopatia e fitoterapia humana e veterinária (FETROW & AVILA, 2000; NASER et al., 2005b); tendo como principais aplicações o tratamento de infecções agudas e crônicas do trato respiratório superior, e como adjuvante dos antibióticos em infecções bacterianas graves, como a bronquite, angina, faringite, otite média e sinusite. Além disso, a tintura tem sido aplicada no trato genital inferior para o tratamento de verrugas, papilomas, condilomas, excrescências de diversos tipos, principalmente aquelas relacionadas ao HPV (FETROW & AVILA, 2000), sendo estimado que a taxa de cura das verrugas seja de 84,2% (NEVES-JORGE et al., 2000). Estes efeitos são atribuídos principalmente as suas atividades antiviral e imunoestimulante já demonstradas em diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* (GOHLA et al., 1992; BODINET et al., 2002; SUNILA; KUTTAN, 2006; SUNILA; HAMSA; KUTTAN, 2011).

3.1.3 Perfil fitoquímico

O perfil fitoquímico de *T. occidentalis* abrange diferentes classes de substâncias como saponinas, fenóis, taninos, aminas, mucilagens, princípios amargos, compostos lactônicos, carotenos, óleo essencial, triterpenos, esteroides (CASTELLÓN et al., 2000), açúcares redutores, cumarinas (ácido p-cumárico e umbelliferona), ácido tânico, polissacarídeos, proteínas e minerais (NASER et al., 2005b). Contudo, os óleos essenciais constituem um dos grupos metabólicos característicos da espécie (SVAJDLENKA et al., 1999), sendo o monoterpene tujona seu principal constituinte (TSIRI et al., 2009). Já em termos de atividade terapêutica, destacam-se os polissacarídeos e os flavonoides. Estes constituintes,

acompanhados dos taninos e proteínas, foram identificados por investigações fitoquímicas na fração etanólica das partes aéreas de *T. occidentalis* utilizada em estudos farmacológicos conduzidos por Dubey e Batra para as atividades antidiabética, hepatoprotetora, hipolipemiante, antioxidante e anti-ulcerativa (2008a, 2008b, 2009a, 2009b, 2009c). Adicionalmente, os polissacarídeos têm sido indicados em vários estudos como os constituintes ativos responsáveis pelas suas atividades antiviral e imunoestimulante (GOHLA et al., 1992; NASER et al., 2005b; SUNILA; HAMSA; KUTTAN, 2011). Um dos estudos mais recentes, realizado por Sunila; Hamsa & Kuttan (2011), revelou que o extrato de *T. occidentalis* e seus polissacarídeos promoveram um aumento da atividade das células NK, da ADCC e da CDC em células metastáticas, além de aumentar os níveis dos fatores antitumorais Interleucina-2 (IL-2) e TIMP; e de diminuir os elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e GM-CSF no soro de animais com tumor (SUNILA; HAMSA; KUTTAN, 2011).

Por este motivo, nos últimos anos a *T. occidentalis* vem sendo associada a outras plantas imunomoduladoras (NASER et al., 2005b; CORRÊA, 2006). Uma destas associações, contendo *Echinacea purpurea*, *Echinaceae pallida* e *Baptisia tinctoria* é produzida atualmente na forma de comprimidos pela *Aspen Pharmacare Australia*. Trata-se do Esberitox® N, fitoterápico clinicamente comprovado para fortalecimento do sistema imunológico e tratamento de sintomas do resfriado comum (ESBERITOX® N, 2014).

3.1.4 Aspectos toxicológicos

Um levantamento feito por Naser et al. (2005a) em torno dos efeitos adversos verificados em ensaios clínicos com *T. occidentalis*, constatou que as preparações obtidas a partir desta planta são consideradas seguras nas infecções do trato respiratório. Contudo, a recomendação geral é que durante a gravidez e lactação, estas preparações não sejam administradas sem o consentimento médico, pois embora não tenham exibido efeito abortivo, ainda verifica-se ausência de resultados

conclusivos.

A toxicidade de *T. occidentalis* também foi avaliada por Valsa & Felzenszwalb (2001) utilizando amostras de três tinturas para verificação da genotoxicidade *in vitro* por meio de dois testes rápidos (teste de Ames - Mutatest e o SOS-cromoteste-indução de β -galactosidase em *Escherichia coli*). Ao fim do estudo, foi constatado que nenhum dos extratos possuiu efetiva indução de mutagênese ou na síntese da β -galactosidase (indicador de sinal geral e precoce de lesão no DNA), mesmo com a metabolização.

Esse resultado foi recentemente confirmado por Nikolić et al. (2011), onde foi analisado o potencial antigenotóxico dos monoterpenos cânfora, eucaliptol e tujona de *T. occidentalis* sobre células procariotas e eucariotas, com elucidação do seu efeito sobre o reparo do DNA. Os resultados obtidos indicaram que pequenas quantidades de cânfora, eucaliptol e tujona podem estimular o processo de reparo do DNA e atuar como antimutagênicos, embora maiores concentrações de monoterpenos possam induzir a rupturas dos filamentos de DNA.

3.2 DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

As plantas medicinais, assim como suas preparações sempre foram utilizadas pelo homem, e embora esta utilização tenha passado por um declínio após a ascensão mundial da terapêutica centrada em fármacos sintéticos, nas últimas décadas vem ocorrendo um retorno ao uso da fitoterapia, tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos (NASCIMENTO et al., 2005; BORELLA et al., 2010). Como consequência, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, se encontra em expansão em todo o mundo e constitui um mercado bastante promissor (NASCIMENTO et al., 2005).

Atualmente, as plantas medicinais movem altos valores financeiros em todo o mundo e representam o tipo de tratamento mais acessível para uma parcela significativa da população, estimada em cerca de 80% (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Em 2010, por exemplo, o mercado mundial de fitoterápicos movimentou cerca

de US\$ 44 bilhões, enquanto que, no Brasil, as estimativas apontam um movimento entre US\$ 350 a 550 milhões (MIOTO, 2010).

De forma geral, os fatores relacionados a esta expansão da fitoterapia deve-se à necessidade de busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento de enfermidades e à preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, somada à crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, ao desenvolvimento de novos métodos analíticos para controle de qualidade; e ao desenvolvimento de novas formas de preparações e administração dos produtos (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Seguindo esta tendência atual, inúmeros estudos têm abordado a análise de espécies vegetais com potencial terapêutico, de modo a contribuir com a descoberta de novas plantas medicinais e com o desenvolvimento de fitoterápicos (MENDEZ et al., 2011), que por sua vez requer conhecimento sobre diversas etapas a serem seguidas com a matéria-prima vegetal, quais sejam: cultivo, coleta, secagem, moagem, extração, avaliação farmacológica e toxicológica e formulação, constituindo assim um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional (TOLETO et al., 2003; BORELLA et al., 2010). Caso essas etapas não sejam realizadas adequadamente, poderão ocorrer alterações na composição química dos compostos bioativos, com consequente interferência na qualidade do produto final (BORELLA et al., 2010). Portanto, o emprego de espécies vegetais como matéria-prima para produção de medicamentos, tem como pré-requisito a padronização das drogas e extratos vegetais, bem como de suas formulações, através de diferentes técnicas, com o objetivo estabelecer suas especificações de qualidade e garantir seus critérios de eficácia e segurança (KLEIN et al., 2009). Ademais, também é imprescindível o monitoramento e controle de todas as etapas envolvidas no processo produtivo.

No Brasil, têm sido tomadas várias providências no sentido de normatizar o uso dos fitoterápicos, através da publicação de resoluções pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a exemplo da RDC nº 48/2004 (BRASIL, 2004); RDC nº 10/2010 (BRASIL, 2010a); e RDC nº 14/ 2010 (BRASIL, 2010b), bem como de decretos e portarias governamentais, a saber Decreto nº 5.813/2006 (BRASIL,

2006); e Portaria nº 2960/2008 (BRASIL, 2008b). Dentre as medidas adotadas, destacam-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos dentro do Sistema Único de Saúde (SUS), com objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008b). Como consequência, o Ministério da Saúde passou a financiar fitoterápicos na rede pública de saúde a partir de 2007 (DIÁRIO DA SAÚDE, 2012), e em 2009 publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) para direcionamento de pesquisas científicas com 71 espécies vegetais de potencial farmacológico, visando ampliar o rol de fitoterápicos financiados pelo Governo Federal (BRASIL, 2009). Inicialmente, apenas dois fitoterápicos constavam na Relação Nacional de Medicamentos essenciais (RENAME) para disponibilização pelo SUS, e atualmente constam 11 produtos, após a última atualização da RENAME no ano de 2012 (DIÁRIO DA SAÚDE, 2012).

Portanto, o desenvolvimento de estudos abordando o desenvolvimento e caracterização de extratos vegetais é uma área de interesse no Brasil e de grande relevância científica e tecnológica.

3.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico, também conhecido como sistema imunitário ou imune, compreende uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas, que interagem para manter a integridade do organismo frente a agentes invasores (bactérias, vírus, parasitas) (MESQUITA-JÚNIOR et al., 2010), evitar comportamentos autodestrutivos e surgimento de doenças autoimunes (CASTRO et al., 2008), além de promover a vigilância contra tumores e rejeição de enxertos não compatíveis (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010).

Os mecanismos envolvidos na função imunológica podem ser inespecíficos, constituindo a imunidade inata ou natural, e específicos, constituindo a imunidade adquirida ou adaptativa (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010). A imunidade inata atua

em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de contato prévio com agentes agressores, sendo a primeira linha de defesa do organismo, e por ser inespecífica, não guarda memória. A resposta imune inata é formada por barreiras estruturais (pele e membranas mucosas), barreiras fisiológicas (pH, nível de oxigênio), células especializadas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* - NK), proteínas do sistema complemento e outras moléculas circulantes e secretadas (interferons - IFN, interleucinas - IL, fator de necrose tumoral - TNF), comumente presentes em todos os indivíduos (CASTRO, 2008; CRUVINEL et al., 2010; DE MACÊDO et al., 2010). Seus mecanismos de maior destaque compreendem a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como a síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (CRUVINEL et al., 2010). Quando essas defesas não são suficientes para destruir os agentes invasores, mecanismos específicos do sistema imunitário adquirido podem ser requisitados para reforçar as respostas imunológicas inespecíficas (SOUZA, 2011).

A imunidade adquirida atua por maior período do que a inata e apresenta especificidade e memória (DE MACÊDO et al., 2010). A especificidade é a capacidade de reconhecer e reagir à determinada molécula e a memória é a capacidade de voltar a reconhecer e reagir rapidamente a esta mesma molécula (antígeno), quando esta for reintroduzida no organismo. Assim, a resposta imune adquirida garante proteção ao organismo contra uma reinfecção (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010) e fornece uma proteção mais efetiva contra patógenos (DE MACÊDO et al., 2010). Os elementos-chave do sistema imunitário adaptativo são linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos, mediadores humorais e citocinas (CASTRO, 2008). Os linfócitos T apresentam-se em populações funcionais distintas: células T auxiliares (CD4+, também chamadas Th ou T *helper*) e células T citotóxicas (CD8+, também chamadas Tc ou T *killer*) e fornecem funções auxiliares, regulatórias e efectoras, constituindo a imunidade mediada por células. Já os linfócitos B contribuem para a resposta imune por meio da secreção de anticorpos ou imunoglobulinas que são subdivididas em cinco classes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, constituindo a imunidade humoral (DE MACÊDO et al., 2010). Uma revisão

detalhada acerca do sistema imunitário inato e adquirido pode ser encontrada, respectivamente, nos estudos realizados por Cruvinel e colaboradores (2010) e MESQUITA-JÚNIOR e colaboradores (2010).

Vale ressaltar que tanto o sistema imunitário inato, como o adquirido, assim como a imunidade celular mediada por células e imunidade humoral se comunicam e compartilham componentes, sendo essa interação fundamental para a imunidade geral. De modo que qualquer desequilíbrio em alguma parte da resposta imunológica pode resultar em uma incapacidade de controlar infecções (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010) e aumento de risco para desenvolvimento de doenças neoplásicas (MUELLER et al., 1995).

3.4 IMUNODEFICIÊNCIAS

As anormalidades do sistema imune, comumente conhecidas como imunodeficiências, são classificadas como primárias ou congênitas, quando as desordens são de origem genética, e secundárias ou adquiridas, quando advêm de uma causa externa ao sistema imunológico (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010).

3.4.1 Imunodeficiências primárias

As imunodeficiências primárias são distúrbios de origem genética que apresentam-se geralmente durante a infância e afetam diferentes componentes da imunidade inata e adaptativa (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010), sendo classificadas de acordo com o sistema que afetam e com a linhagem celular envolvida (CASTRO, 2008).

Enquanto os distúrbios do sistema imune inato incluem desordens fagocitárias, deficiências do complemento e distúrbios de sinalização celular, as deficiências imunológicas adaptativas envolvem desordens de células T, também chamada de deficiências imunológicas celulares, e desordens de células B, que são

mais frequentes, representando mais de 50% das imunodeficiências primárias no mundo. Ainda que essas desordens sejam categorizadas ordenadamente em tal forma, é importante ressaltar que todos os componentes do sistema imune são interdependentes. De modo que, desordens de células T, por exemplo, podem levar a algum grau de disfunção das células B, devido à dependência dos linfócitos T *helper* para produção de anticorpos (CASTRO, 2008).

Vale ressaltar ainda que mais de 200 imunodeficiências primárias têm sido descritas (SRINIVASA et al., 2012) e que novas formas da doença têm sido descobertas, em virtude dos avanços nos métodos diagnósticos e estudos genéticos (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010). Além disso, um número crescente de adultos está sendo diagnosticado, com taxas mais elevadas em populações com altas taxas de consanguinidade ou entre populações geneticamente isoladas (SRINIVASA et al., 2012). Por outro lado, mesmo diante deste novo cenário, a real incidência das imunodeficiências primárias permanece incerta, diante da subnotificação dos casos existentes (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010). Uma classificação minuciosa dessas deficiências pode ser encontrada no estudo de Dornas; Robazzi & Silva, (2010).

3.4.2 Imunodeficiências secundárias

As imunodeficiências secundárias são mais comuns do que as primárias, e podem ser adquiridas através da exposição a uma variedade de fatores extrínsecos, incluindo desnutrição, infecções, medicamentos, doenças metabólicas, neoplásicas e genéticas, cirurgias, traumas, idade, e condições ambientais adversas, que podem afetar tanto a imunidade inata como a adaptativa, de diversas maneiras e com gravidades distintas (CHINEN et al., 2008). Estão descritas abaixo algumas causas que frequentemente comprometem o sistema imunológico.

3.4.2.1 Desnutrição

Uma alimentação balanceada é essencial para o funcionamento adequado do sistema imune, como já demonstrado em uma série de estudos. Diante de uma nutrição desequilibrada, os componentes necessários para gerar uma resposta imunológica eficaz podem encontrar-se reduzidos (AFACAN; FJELL; HANCOCK, 2012; PONTON et al., 2013). Além do desequilíbrio alimentar, as carências nutricionais podem ser decorrentes de doenças específicas (CHINEN et al., 2008), como enteropatia perdedora de proteína (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010) ou de situações que induzem stress metabólico, tais como infecções, queimaduras, traumatismos e cirurgias (PEREIRA, 2007).

Na maioria das vezes a desnutrição envolve escassez de proteínas e micronutrientes. No cenário epidemiológico, a desnutrição energético proteica é a causa mais prevalente de imunodeficiência secundária no mundo (CHINEN et al., 2008), sendo as crianças mais vulneráveis aos seus efeitos, uma vez que a infância é caracterizada como um período crítico para o desenvolvimento da defesa imunológica (DE MACÊDO et al., 2010).

Micronutrientes também desempenham um papel fundamental no suporte da função imunológica adequada. As deficiências de vitaminas e minerais, por exemplo, podem afetar as barreiras físicas, a resposta celular e a produção de anticorpos (CASTRO, 2008). Tem sido demonstrado que os minerais cobre, zinco e magnésio atuam como cofatores de enzimas responsáveis por diversas atividades metabólicas e pela resposta imune inata e adquirida, além de exercerem um papel importante na maturação dos tecidos e células linfoides. De modo que uma alteração dos seus níveis séricos, em caso de desnutrição grave, pode comprometer a imunocompetência através de neutropenia e linfopenia (DE MACÊDO et al., 2010). Castro (2008) cita ainda a importância das vitaminas A, C e D na imunorregulação.

Vale ressaltar, contudo, que os efeitos da deficiência de nutrientes sobre a resposta imune dependem da magnitude, duração e do período do agravo (DE MACÊDO et al., 2010); e que a reposição e recuperação nutricional geralmente

resulta na resolução dos defeitos imunológicos (CHINEN et al., 2008). Uma abordagem das descobertas recentes em pesquisa nutricional no contexto de estudos imunológicos pode ser encontrada no estudo realizado por Ponton e colaboradores (2013).

3.4.2.2 Infecções

A relação entre infecção e imunidade é interativa, de modo que tanto pode ser causa, como efeito de imunodeficiência (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010). Embora a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) seja o exemplo mais conhecido, muitos agentes infecciosos podem perturbar o sistema imune direta ou indiretamente (CHINEN et al., 2008; DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010). Em alguns casos, pode haver um estímulo excessivo do sistema imunitário, levando a um estado sem resposta, tal como a anergia das células T, observada após a síndrome do choque tóxico induzido pelos superantígenos estafilococos. Algumas infecções virais, como sarampo, citomegalovírus, e influenza, também podem induzir anergia de células T, além de linfopenia, embora transitória e geralmente menos severa do que a observada na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Em outros casos, a destruição tecidual ou a reação inflamatória a uma infecção particular pode facilitar o acesso para que outros micro-organismos desenvolvam infecções secundárias. (CHINEN et al., 2008).

Vale ressaltar que embora a desnutrição severa seja a condição causadora de imunodeficiência adquirida mais prevalente no mundo (CELANO et al., 2007), uma das causas mais conhecidas é resultante de infecção por HIV (CASTRO, 2008). Isto porque, além da alta prevalência e alta taxa de mortalidade quando não tratada, o número de pesquisas relacionadas é bastante superior em relação ao de outras imunodeficiências secundárias (CHINEN et al., 2008).

3.4.2.3 Medicamentos

A disfunção imune induzida por medicamentos pode ser intencional, através da administração de drogas imunossupressoras (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010), como requisitado para pacientes portadores de doenças autoimunes (GREENBERG, 2002), doenças neoplásicas (YEE & CHRISTOU, 1993) e pacientes transplantados; ou eventual, advinda de reações adversas a agentes terapêuticos, como anticonvulsivantes e sulfonamidas (CASTRO, 2008).

Dentre as drogas imunossupressoras utilizadas na terapia de doenças autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, destacam-se os corticosteroides, e algumas drogas citotóxicas, como ciclofosfamida, azatioprina e metotrexato (GREENBERG, 2002). Greenberg (2002) correlaciona em seu estudo de revisão alguns medicamentos utilizados no tratamento de doenças reumáticas com as desordens imunológicas e patógenos predominantemente associados à cada terapia. O autor relacionou ainda a ocorrência de algumas infecções com os medicamentos modificadores de resposta biológica infliximabe e etanercepte, ambos utilizados no tratamento da artrite reumatoide.

Outra classe medicamentosa que se destaca pelos efeitos deletérios sobre o sistema imune, sobretudo sobre a resposta imunológica mediada por células, são os anestésicos, figurando dentre estes o sevoflurano, os opioides e o propofol. No entanto, os efeitos destes medicamentos sobre a imunidade parecem ser menos expressivos em comparação aos efeitos do stress induzido por processo cirúrgico (CASTRO, 2008).

3.4.2.4 Doenças neoplásicas

O sistema imunológico possui relação direta com os processos carcinogênicos, de modo que semelhante aos processos infecciosos, as imunodeficiências podem ser causa ou consequência de uma doença neoplásica (YEE & CHRISTOU, 1993; SUCHKOV et al., 2007). O desenvolvimento de um

linfoma não-Hodgkin, por exemplo, tem sido relacionado com o estado imunocomprometido do paciente com linfoma de Hodgkin (MUELLER et al., 1995).

Adicionalmente grande parte das progressões de tumores são caracterizadas pela fuga de vigilância imunológica. Em algumas doenças neoplásicas, como glioblastoma multiforme e algumas das neoplasias epiteliais, como, os tumores de células basais, o comprometimento da resposta imunológica pode inclusive contribuir para as propriedades invasivas e metastáticas do tumor, levando a um agravamento da forma clínica e deterioração do estado de saúde (SUCHKOV et al., 2007). Ademais, algumas condições, como terapia com agentes imunossupressores, quimioterapia e radioterapia, contribuem para comprometimento do sistema imune em pacientes com câncer (MUELLER et al., 1995).

3.4.2.5 Cirurgia e traumatologia

O rompimento e perda de barreiras epiteliais, a ativação celular não específica concomitante a um estado imune anérgico, e níveis elevados de cortisol induzidos pelo stress podem contribuir para a imunossupressão de um paciente lesionado por processo cirúrgico ou traumatismo (CHINEN et al., 2008), o que pode resultar em infecção, má cicatrização de feridas, síndrome de resposta inflamatória sistêmica e propagação de doenças malignas. Em geral, estes efeitos correlacionam-se com a gravidade do trauma e do procedimento cirúrgico, e são acentuados em pacientes já imunocomprometidos (CASTRO, 2008).

Pacientes com trauma térmico, por exemplo, geralmente são mais susceptíveis a infecções do que pacientes atingidos por outros fatores traumáticos (BEVILACQUA et al., 1997). E em alguns casos cirúrgicos, como esplenectomia eletiva (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010), recomenda-se inclusive a realização de uma imunização prévia dos pacientes, devido à alta susceptibilidade a infecções (CHINEN et al., 2008). Além de imunização, uma imunomodulação nutricional ou farmacológica pode ser necessária para melhorar a função imune de pacientes que serão submetidos a processos cirúrgicos, e que possuem deficiências nutricionais ou

comprometimento do sistema imunológico, sobretudo na presença de fatores complicadores como doenças subjacentes, uso de medicamentos e anestesia (YEE & CHRISTOU, 1993).

3.4.2.6 Doenças metabólicas

Algumas doenças metabólicas, como diabetes mellitus (CHINEN et al., 2008) e uremia (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010), causam efeitos deletérios sobre a imunidade, decorrente de uma série de ações defeituosas nas funções do sistema imune, incluindo, entre outras, a fagocitose, a quimiotaxia e a resposta linfoproliferativa a mitógenos (CHINEN et al., 2008). Pacientes com uremia, por exemplo, apresentam uma incidência significativamente maior para tuberculose, em comparação aos pacientes não urêmicos (FUCK et al., 2004). Vale salientar, contudo, que o controle das anormalidades metabólicas geralmente conduz a uma melhoria da função imunológica (CHINEN et al., 2008).

3.4.2.7 Outras condições

O sistema imunológico pode ser afetado ainda por uma série de fatores, quais sejam: idade, notadamente em recém-nascidos (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010) e idosos (YEE & CHRISTOU, 1993); condições patológicas de origem genética, como fibrose cística, doença falciforme (CASTRO, 2008), Síndrome de Turner (CHINEN et al., 2008) e Síndrome de Down (RAM & CHINEN, 2011); exposição crônica a condições ambientais adversas, como frio extremo, altitude elevada, exposição a luz ultravioleta e radiação ionizante; hipóxia crônica ocasionada em voos espaciais de longa duração (CHINEN et al., 2008); estresse; e condições patológicas diversas, como depressão (SEPHTON et al., 2009) e anorexia nervosa, cujo comprometimento do sistema imune é resultante de desnutrição, associada também a efeitos adicionais do Sistema Nervoso Central (SNC), geralmente

estresse e depressão (ALLENDE et al., 1998).

É importante destacar que a prevalência das deficiências imunológicas de origem secundária entre as diferentes regiões do mundo é bastante variável. Enquanto algumas condições são mais comuns em países subdesenvolvidos, como é o caso da imunodeficiência causada pelo HIV e desnutrição; as causas iatrogênicas, como a imunodeficiência causada por quimioterapia, são mais comuns em países desenvolvidos (CASTRO, 2008).

Outro ponto de grande relevância é que embora as anormalidades secundárias possam afetar a imunidade inata e adaptativa, com manifestações clínicas geralmente heterogêneas (CHINEN et al., 2008), um espectro similar de doenças, caracterizado por infecções recorrentes ou persistentes frequentemente atinge pacientes imunossuprimidos (DORNAS; ROBAZZI; SILVA, 2010), como é o caso da tuberculose (FUCK et al., 2004). Ademais, as desordens também estão associadas com aumento de risco para desenvolvimento de doença neoplásica, sendo esta umas das principais causas de morte, ficando atrás apenas dos processos infecciosos (MUELLER et al., 1995). Isto porque praticamente, todas as partes do sistema imunológico, sobretudo a resposta celular mediada pelos linfócitos T, contribuem para a erradicação de células tumorais (SUCHKOV et al., 2007), assim como conferem proteção contra uma gama de agentes patogênicos para o qual os pacientes com câncer podem ser particularmente sensíveis (SEPHTON et al., 2009).

Dentre os tumores mais comuns, destacam-se os linfomas *não-Hodgkin* e o sarcoma de *Kaposi*, seguidos de carcinomas de pele, linfomas de *Hodgkin* e leucemias. Contudo, o risco para o desenvolvimento de câncer é dependente do tipo de imunodeficiência subjacente, da idade do paciente e de cofatores como infecções virais, além de outras condições como terapia com imunossupressores, quimioterapia e radioterapia (MUELLER et al., 1995).

Existe uma forte evidência de correlação entre as infecções virais e as doenças neoplásicas; tal como relatado para os vírus de DNA, como o herpes simples com o carcinoma cervical; e o vírus da hepatite B com o câncer primário do fígado. O mesmo ocorre para infecções causadas por retrovírus, como o HIV, que

apesar de não ser considerado oncogênico por si só, tem sido intimamente associado com câncer (MUELLER et al., 1995), como demonstrado para o Sarcoma de Kaposi, neoplasia hepática mais comum em pacientes com AIDS (DA COSTA et al., 2008). Além do mais, a infecção por HIV está fortemente associada com a alta prevalência, incidência e persistência de infecção pelo Papiloma vírus humano (HPV) e, assim, influencia diretamente na persistência e progressão para a neoplasia intraepitelial cervical e para o câncer cervical invasivo (CRUZ & MELO, 2010).

Sephton e colaboradores (2009) destacaram ainda a relação existente entre depressão, estresse e função imune no contexto do câncer de mama avançado, pois a aflição psicológica e depressão, que muitas vezes acompanham o diagnóstico e tratamento do câncer, promovem supressão ou desregulação da função imune, contribuindo também para o desenvolvimento e propagação da doença neoplásica.

Diante deste cenário, ao considerar um diagnóstico de imunodeficiência, os médicos devem estar atentos aos diversos fatores que afetam o sistema imune (CHINEN et al., 2008), podendo recorrer a terapias capazes de exercer ação imunomoduladora por proliferação de determinadas células deste sistema, ou alargando a eficiência das substâncias por elas produzidas (BEVILACQUA et al., 1997). Abaixo encontra-se descrito uma breve discussão sobre a terapia imunoestimulante existente no mercado.

3.5 TERAPIA IMUNOESTIMULANTE

Os agentes imunoestimulantes são compostos capazes de estimular o sistema imunitário, melhorando a resposta imune do hospedeiro contra agentes patógenos (CAVALCA, 2003; FRASSON, 2004), através de mecanismos, comumente relacionados ao sistema imune inato, tais como suporte à função dos linfócitos T e ativação de macrófagos, granulócitos, sistema complemento e células NK. De tal modo que constituem uma terapia alternativa à quimioterapia convencional para uma variedade de condições patológicas associadas à deficiência

imunológica (BENMEBAREK et al., 2013). Contudo, devido ao fato, da sua ação ser sobre a resposta imune não-específica, a “memória” do sistema imunológico não é afetada. Por conta disso, os agentes imunoestimulantes, geralmente são utilizados periodicamente ou de maneira contínua (FRASSON, 2004).

No mercado podem ser encontradas algumas opções terapêuticas, figurando dentre elas: o uso de imunoglobulinas humanas; a suplementação com arginina, glutamina e vitamina D; e o tratamento com o fitoterápico Esberitox® N. As preparações de imunoglobulina humana para uso terapêutico podem ser poli-específicas ou específicas. As poli-específicas, têm como componente principal a IgG; e são utilizadas por via intravenosa, embora haja relatos de utilização por via subcutânea, intratecal, oral e até intra-auricular (KOVALHULK, 2013). Já as específicas são aquelas que possuem altos títulos de anticorpos específicos, como a imunoglobulina antivaricela; e podem ser usadas por via intravenosa ou intramuscular, dependendo do tipo de produto e fabricante (SIQUEIRA, 2012). É importante mencionar que precauções devem ser tomadas para evitar potenciais complicações dessa terapia, como isquemia transitória ou complicações tromboembólicas (KOVALHULK, 2013; SIQUEIRA, 2012).

Já a arginina e glutamina constituem nutrientes com importante efeito imunomodulador. Enquanto a arginina é precursora do óxido nítrico (NO) e aumenta a resposta dos linfócitos T, a glutamina é um substrato essencial para enterócitos, macrófagos e fibroblastos (PEREIRA, 2007) e proliferação dos linfócitos. Desta forma, a suplementação com estes aminoácidos em pacientes imunossuprimidos pode ser favorável. Embora a glutamina livre não possa ser incluída em terapias nutricionais devido a sua instabilidade durante estocagem e esterilização pelo calor, existem evidências que a glutamina, presente em dipeptídeos sintéticos, como a L-alanil-L-glutamina possui eficiência em humanos (MASSAMBAMI & BAZOTTE, 1998).

De maneira geral, o efeito da vitamina D no sistema imunológico se traduz em aumento da imunidade inata associado a uma regulação multifacetada da imunidade adquirida. Estudos atuais têm relacionado a deficiência de vitamina D com várias doenças autoimunes, como esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico

(MARQUES et al., 2010). Embora pouco se tenha conhecimento sobre os efeitos da reposição da vitamina D na prevenção e tratamento dessas doenças, estudos em modelos experimentais e com humanos apontam efeitos benéficos dessa suplementação (PLUDOWSKI et al., 2013; MARQUES et al., 2010). Deve-se estar atento, no entanto, aos efeitos tóxicos da suplementação excessiva, tendo em vista que as intoxicações por vitamina D tem sido relatadas com maior frequência nos últimos anos (ÖKZAN, HATUN E BEREKET, 2012).

Por sua vez, o Esberitox® N é um fitoterápico produzido na Alemanha pela *Aspen Pharmacare Australia*® utilizado para aumento da imunorresistência do organismo, sendo indicado para o tratamento dos sintomas do resfriado comum; e fortalecimento do sistema imunológico de indivíduos com suscetibilidade aumentada para infecções, devido a fatores como estresse, falta de sono, ou tensão nervosa. Além disso, pode ser utilizado como terapia concomitante ao tratamento com antibióticos, para impedir seu efeito imunossupressor; de modo que as infecções recuem rapidamente e recidivas sejam evitadas (ESBERITOX® N, 2014). Este fitoterápico, na forma de comprimidos, contém 3,2 mg de extrato seco das raízes de *Echinacea* (*E. pallida*/ *E. purpurea*), raízes de *Baptisia tinctoriae* e folhas de *T. occidentalis*, com eficácia clínica demonstrada em diversos estudos clínicos controlados por placebo (REITZ & HERGARTEN, 1990; BODINET & FREUDENSTEIN, 1999), sendo o de Naser et al. (2005a), o estudo mais recente.

O potencial imunofarmacológico de Esberitox® N tem sido ainda estabelecido por vários modelos de teste *in vitro* e *in vivo* (HAUKE et al., 2002; TEUSCHER et al., 2004; BODINET et al., 2004), sendo as atividades imunoestimulantes e antivirais comprovadas tanto para as drogas individuais em si, como para o extrato da mistura. No entanto, sua distribuição ainda não é realizada no Brasil.

3.5.1 Plantas medicinais com atividade imunoestimulante

As plantas medicinais são utilizadas desde os tempos antigos como recurso terapêutico para tratamento e prevenção de diversas doenças; e mesmo diante dos

avanços da indústria química, continuam sendo utilizadas mundialmente, seja como remédio tradicional, seja em formulações fitoterápicas. Adicionalmente, também se destacam como fonte de novas entidades químicas para desenvolvimento de medicamentos (ARCHANA, 2011).

Apesar do grande arsenal de propriedades terapêuticas relatadas para as plantas medicinais, muitos estudos têm dado ênfase a investigação de espécies com atividade imunomoduladora (ARCHANA, 2011). De modo que diversos extratos vegetais têm sido amplamente investigados em diferentes partes do mundo, levando inclusive ao isolamento de moléculas bioativas, com potencial atividade imunomoduladora (ALAMGIR & UDDIN, 2010).

A imunomodulação conferida pelas plantas medicinais e seus derivados vegetais têm sido alvo de avaliação há muitos anos, e permanece como um importante foco de pesquisa, de modo que nos últimos anos, vários extratos, compostos e formulações tem sido patenteados, demonstrando o grande potencial existente para a descoberta de agentes imunomoduladores de origem natural (ALAMGIR & UDDIN, 2010), sobretudo com ação imunoestimulante (GAUR; KORI; NEMA, 2009).

Na literatura é possível constatar diversas espécies com atividade imunoestimulante, dentre elas: *T. occidentalis* (GOHLA et al., 1992; BODINET et al., 2002; SUNILA; HAMSA; KUTTAN, 2011), *Ocimum sanctum* L., *Phyllanthus niruri* L., *Crossandra infundibuliformis* (L.) Nees, *Piper betel* L., *Mentha piperita* L. (KUMAR et al., 2013) e *Panax ginseng* C. A. Mey (LIU et al., 2011). Algumas já tem eficácia e segurança clínica comprovadas, como as espécies *B. tinctoriae*, *E. pallidae*/ *E. purpureae* e *T. occidentalis*, que compõem o Esberitox® N (Esberitox® N, 2014; NASER et al., 2005b). Enquanto outras têm seu uso pautado na medicina tradicional, com poucos ou quase nenhum estudo que comprove sua atividade. Pode-se citar *Eleutherine americana*, utilizada contra o câncer de mama em populações locais da Indonésia (SONG et al., 2009); *Quillaja saponária* que tem sido testada como adjuvante em vacinas (KUSHWAHA et al., 2012); e *Trigonella foenum graecum*, que tem sido usada na medicina tradicional Ayurveda e Unani no Sul da Ásia (BIN-HAFEEZ et. al., 2003).

Somado à aplicação terapêutica, um grande número de plantas tem desempenhado uma importante função na aquicultura, atividade em constante expansão; mas que enfrenta desafios relacionados ao surgimento de doenças microbianas e virais (MEDINA-BELTRÁN et al., 2012). Neste sentido, o uso de plantas na suplementação alimentar de organismos aquáticos tem sido uma alternativa bastante viável para contornar as dificuldades dessa prática; não só pela propriedade fortalecedora do sistema imune (CHANG et al., 2012), mas também por constituírem uma rica fonte de compostos químicos, em geral, segura e de baixo custo (CITARASU et al., 2002).

Camellia sinensis L., *Nyctanthes arbortristis* L., *Toona sinensis* (A. Juss.) M. Roem., *Eclipta alba* (L.) Hassk., *Solanum trilobatum* L., *Lonicera japonica* Thunb., por exemplo, são bastante conhecidas por aumentar a resposta imune e a resistência a doenças em tilápia contra *Aeromonas hydrophila* (Wu, 2013). Assim como a *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg., *Viscum album* L., *Achyranthes áspora* L., *E. alba*, *S. trilobatum* L. são conhecidas por combater infecções causadas por *Aeromonas* sp. (KALEESWARAN; ILAVENIL; RAVIKUMAR, 2011).

Uma série de estudos tem relatado os efeitos dessa aplicação na aquicultura, bem como os mecanismos de ação envolvidos no fortalecimento do sistema imunológico. Dentre os efeitos, destacam-se o ganho de peso (CHANG et al., 2012; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2012; YOGESWARAN et al., 2012; TALPUR, IKHWANUDDIN & BOLONG, 2013) e aumento de sobrevivência dos organismos (CHANG et al. 2012; HARIKRISHNAN et al., 2012a; HARIKRISHNAN et al., 2012b; HARIKRISHNAN et al., 2012d; MEDINA-BELTRÁN et al. 2012; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2012; YOGESWARAN et al., 2012; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2013; TALPUR, IKHWANUDDIN & BOLONG, 2013). No que diz respeito aos mecanismos, os estudos têm apontado uma forte atuação dos derivados vegetais na modulação da resposta imunitária não específica, como disposto no Quadro 1.

Outros mecanismos também têm sido relatados, como, por exemplo, o aumento da atividade das células NK (SONG et al., 2012; KRIFA et al. 2013), o aumento da adesão de neutrófilos (GHULE & YEOLE, 2012; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2012; TALPUR, IKHWANUDDIN & BOLONG, 2013), o aumento de

esplenócitos (ABID et al., 2012; ARANHA, CLEMENT; VENKATESH, 2012; KRIFA et al. 2013), o aumento de imunoglobulinas (ABID et al., 2012; GHULE & YEOLE, 2012), o aumento de lisozimas (TALPUR & IKHWANUDDIN, 2012; KUMAR et al., 2013; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2013; WU et al., 2013) e o aumento da transcrição de Fator Nuclear κ B (NF- κ B) (KOUAKOU et al., 2013); o que reforça ainda mais o grande potencial imunomodulador existente no reino vegetal.

Quadro 1. Principais mecanismos de ação relacionados a atividade imunoestimulante dos derivados vegetais.

Mecanismo de ação	Referência
Aumento da atividade fagocítica	ABID et al., 2012; ARANHA, CLEMENT; VENKATESH, 2012; CHANG et al. 2012; GHULE & YEOLE, 2012; HARIKRISHNAN et al., 2012a; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2012; SHARMA, et al., 2012; SONG et al., 2012; VERMA et al., 2012; KIM et al. 2013; KRIFA et al. 2013; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2013.
Aumento da proliferação de leucócitos	Neutrófilos (GHULE & YEOLE, 2012; HARIKRISHNAN et al., 2012d; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2012; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2013; TALPUR, IKHWANUDDIN & BOLONG, 2013); Basófilos / eosinófilos (TALPUR & IKHWANUDDIN, 2012; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2013); e Linfócitos (ABID et al., 2012; HARIKRISHNAN et al., 2012a; HARIKRISHNAN et al., 2012d; KUMAR et al., 2012; KUSHWAHA et al. 2012; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2012; TALPUR & IKHWANUDDIN, 2013; TALPUR, IKHWANUDDIN & BOLONG, 2013).
Aumento da produção de citocinas	IL-1, IL-10, GM-CSF (KOUAKOU et al., 2013); IL-2 (KUMAR et al., 2012); IL-6 (KOUAKOU et al. 2013; LENZI et al., 2013); TNF-α (ABID et al., 2012; KIM et al. 2013; KOUAKOU et al., 2013; LENZI et al., 2013); IL-4, IFN-γ (ABID et al., 2012; KUSHWAHA et al. 2012).
Aumento da produção de NO	ABID et al., 2012; ARANHA, CLEMENT; VENKATESH, 2012; KIM et al. 2013; KOUAKOU et al. 2013; KRIFA et al. 2013; LENZI et al., 2013

Legenda: IL – Interleucina; GM-CSF – Fator de estimulação de colônias granulócitos e macrófagos; TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ – Interferon gama, NO – Óxido nítrico.

Contudo é importante frisar que estes mecanismos podem variar conforme a dose administrada, como demonstrado por Harikrishnan et al. (2012a); Harikrishnan et al. (2012b); Harikrishnan et al. (2012c); Harikrishnan et al. (2012d); Medina-

Beltrán et al. (2012); Song et al. (2012); Talpur & Ikhwanuddin (2012); Yogeeswaran et al. (2012); Lenzi et al. (2013); Talpur & Ikhwanuddin (2013); e Talpur, Ikhwanuddin & Bolong (2013).

Ademais, outras atividades também têm sido demonstradas em associação com a atividade imunoestimulante, como a atividade anti-inflamatória citada por Ahn et al., 2013 para diversas algas marinhas; as atividades anti-inflamatória, antibiótica, antioxidante e hepatoprotetora mencionada na literatura para os glicosídeos feniletanóides presentes em *L. Purpurascens* (SONG et al., 2012). Além da atividade antitumoral relatada para diversas espécies, a saber: *Actinidia eriantha* (SUN et al., 2009; XU et al., 2009a; XU et al., 2009b); *Codonopsis pilosula* (XU et al., 2012); *Croton lechleri* Mull. Arg. (ALONSO-CASTRO et al., 2012); *Dioscorea bulbifera* L. (WANG et al., 2012); *Limonium sinense* Kuntze (TANG et al., 2012); *Sophora flavescens* Ait. (BAI et al., 2012); e *T. occidentalis* (BISWAS et al, 2011; SUNILA, HAMSA; KUTTAN, 2011).

3.5.2 Compostos vegetais com atividade imunoestimulante

Os compostos bioativos de plantas utilizadas na medicina popular despertam grande interesse científico, uma vez que sua elucidação química aliada ao estudo da atividade biológica comprovam a eficácia desse uso popular e representam uma proposta interessante para a pesquisa com plantas medicinais. Assim, a biodiversidade da flora brasileira passa a ser vista com grande interesse pelas indústrias de medicamentos, cosméticos e alimentos do mercado nacional e mundial (NASCIMENTO, 2012).

Diversas são as espécies de plantas medicinais que contêm propriedades imunoestimulantes, atribuídas ao seu diverso conteúdo de metabólitos. Segundo levantamento feito por Kumar et al. (2012), destacam-se entre os constituintes químicos imunomoduladores os polissacarídeos, flavonoides, alcaloides, saponinas, cumarinas, taninos e os terpenos e terpenoides que compõe os óleos essenciais.

A seguir serão abordados alguns aspectos e atualidades acerca das principais

classes de metabólitos imunoestimulantes.

3.5.2.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros formados pela condensação de um grande número de monossacarídeos, mutuamente unidos por ligações O-glicosídicas (REN; PERERA; HEMAR, 2012); e encontram-se largamente distribuídos em plantas, micro-organismos (fungos e bactérias), algas e animais; desempenhando um papel fundamental na comunicação célula-célula, na adesão celular e no reconhecimento molecular do sistema imunológico e, como tal, são biomacromoléculas essenciais aos organismos vivos (YI et al. 2012; ZENG et al., 2015); apresentando um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo radioproteção e as atividades antitumoral, antioxidante, antilipidêmica (ZENG et al., 2015) e que proporcionam uma oportunidade para descoberta de novos agentes terapêuticos, especialmente relacionados à ação imune.

Esse grupo de metabólitos modula essencialmente a imunidade inata e, mais especificamente, a função dos macrófagos (ALAMGIR & UDDIN, 2010; LENZI et al., 2013). De modo que uma série de mecanismos tem sido descritos na literatura ao longo dos anos. Os polissacarídeos detectados como os componentes ativos do extrato de *Salicornia herbacea* L., por exemplo, atuam ativando as células monocíticas e induzindo à sua diferenciação em macrófagos (ALAMGIR & UDDIN, 2010). Em *Dendrobium officinale* (Tiepishihu), o extrato bruto de polissacarídeos do tronco e suas frações, compostas principalmente por manose e glicose, promoveram proliferação de esplenócitos, reforço da fagocitose e da citotoxicidade mediada por células NK, aumento da produção de NO pelos macrófagos; além de estimulação da secreção de citocinas, tanto em esplenócitos como em macrófagos. (XIA et al., 2012). Em se tratando da alga vermelha *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nägeli, os polissacarídeos com propriedades imunomoduladoras demonstraram indução da produção de NO e das citocinas TNF- α e IL-6 em macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7 (Abdala-Díaz et al., 2010).

Por sua vez, os efeitos imunomoduladores dos polissacarídeos de *Cistanche deserticola* Y. C. Ma, foram avaliados por meio da proliferação *in vitro* dos linfócitos, utilizando o método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (ALAMGIR & UDDIN, 2010). E com relação aos polissacarídeos da polpa do fruto Longan (*Dimocarpus longan* Lour.), deu-se destaque à fração composta pelo complexo polissacarídeo-proteína – LP II, que além de ter estimulado significativamente a proliferação de linfócitos e a fagocitose dos macrófagos, ainda apresentou um bom rendimento, podendo ser explorada como um potencial imunoadjuvante (YI et al., 2012).

Ademais, algumas plantas medicinais empregadas em formulações fitoterápicas, como as espécies *B. tinctoriae* radix, *E. pallidae* radix, *E. purpureae* radix e *T. occidentalis* Linn, que juntas compõem o Esberitox® N, têm sido referenciadas na literatura como tendo propriedade imunoestimulante associada aos polissacarídeos e glicoproteínas (NASER et al., 2005b). Em se tratando do gênero Echinacea, suas preparações são bem conhecidas e têm sido empregadas por várias décadas na prevenção e tratamento de gripes e resfriados (JAWAD et al., 2012). De acordo com dados relatados na *Nutrition Business Journal*, as vendas de produtos de Echinacea nos Estados Unidos giram em torno \$ 120.000.000 anualmente. Vale ressaltar, que as preparações de Echinacea, podem ter um efeito estimulador ou supressor sobre a imunidade inata, dependendo da natureza da preparação utilizada, sendo o aumento da imunidade atribuído aos extratos aquosos, contendo componentes hidrofílicos, como polissacarídeos e/ou lipopolissacarídeos e lipoproteínas, que atuam através do aumento de citocinas por macrófagos e monócitos (CECH et al., 2010).

Somado aos resultados promissores demonstrados em avaliações farmacológicas, os estudos de identificação e isolamento tem alcançado contribuições relevantes neste campo de pesquisa. Alguns trabalhos realizados com a microalga verde comestível *Chlorella pyrenoidosa* Starr & Zeikus obtiveram o isolamento de componentes cíclicos e lineares β -(1 $\rightarrow$ 2)-D-glucanos (SUÁREZ et al., 2008), além de frações de alto peso molecular, com propriedade imunoestimulante de maior significância (SUÁREZ et al., 2010).

Adicionalmente, outros trabalhos também tem apontado o isolamento e a identificação desses metabólitos, dentre os quais podemos citar as xiloglucanas, hetro-polissacarídeos de armazenamento das sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf., *Hymenaea courbaril* L. e *Tamarindus indica* L. (DO ROSÁRIO et al., 2011); os (1→6)-β-D-glucanos isolados a partir de *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach e de *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (SMIDERLE et al., 2013); as frações polissacarídicas, contendo arabinogalactano tipo II, das folhas de *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (KOUAKOU et al., 2013); e as arabinoxilanas do farelo de trigo (*Triticum aestivum*), que além de efeito imunoestimulante, também mostraram efeitos protetores contra a gripe aviária (AKHTAR et al., 2012).

Paralelamente, ao longo dos anos, determinados tipos de polissacarídeos tem revelado considerável potencial farmacológico para aplicações na indústria de ingredientes naturais funcionais, a exemplo dos polissacarídeos sulfatados encontrados em algas marrons (WIJESINGHE & JEON, 2012) e em raízes de *Potentilla anserina* L (CHEN et al., 2010). As raízes dessa espécie têm sido indicadas para utilização com propósito farmacêutico e alimentício e representam uma rica fonte para a descoberta de novos compostos de valor medicinal, tendo exibido potente propriedade imunomoduladora *in vitro* e *in vivo*, através da modulação das funções fagocíticas, da atividade da fosfatase ácida e da lactato desidrogenase, dos níveis de IFN-γ e IL-10; e da proliferação de linfócitos do baço (CHEN et al., 2010).

Ainda sobre a aplicabilidade dos polissacarídeos sulfatados, o estudo realizado por Bhatia et al. (2013) demonstrou eficiência do composto *porphyran* presente na alga vermelha *Porphyra vietnamensis* frente aos efeitos secundários de mielossupressão induzidos por ciclofosfamida. E os ensaios realizados por Wang et al. (2013) provaram que os polissacarídeos sulfatados extraídos do corpo do cogumelo *Ganoderma lucidum* evidenciaram melhor bioatividade do que seus derivados carboximetilados.

Além da ação imunoestimulante, os polissacarídeos sulfatados podem atuar ainda como pro-inflamatórios ou imunossupressores, sendo sua atividade

influenciada por diversos parâmetros, dentre os quais figuram a estrutura química, o peso molecular, e a heterogeneidade dos sítios sulfatados (BHATIA et al., 2013). No que diz respeito ao peso molecular, diversos autores têm relatado que os polissacarídeos de maior peso molecular possuem ação imunoestimulante mais proeminente (SUÁREZ et al., 2010; REN; PERERA; HEMAR; 2012; KOUAKOU et al., 2013). Kouakou et al. (2013) isolaram e caracterizaram 4 frações e 2 subfrações de polissacarídeos, com diferentes pesos moleculares (4,9-39,5 kDa), do extrato aquoso das folhas de *A. cordifolia*. A subfração de maior peso molecular (39,5 kDa) foi a fração altamente ativa nos testes biológicos, enquanto a subfração de baixo peso molecular (5,9 kDa) foi inativa ou minimamente ativa. Os autores sugeriram então que esta pode ser uma característica comum dos polissacarídeos das plantas que modulam as funções dos macrófagos, como anteriormente demonstrado em uma série de estudos, como o de Suárez et al. (2010), cuja atividade biológica foi relacionada com o aumento do peso molecular dos polissacarídeos.

Kouakou et al. (2013) também avaliaram a correlação entre a presença de polifenóis nas frações de polissacarídeos com as atividades avaliadas, tendo em vista que esses compostos podem ser capazes de alterar a conformação dessas macromoléculas através de ligações intermoleculares. Contudo, os autores demonstraram que as atividades das frações não foram associadas com o teor de polifenóis, embora tenham sugerido que esta relação pode ser diferenciada de acordo com as espécies e /ou tipo de atividade celular. Pois, a fração altamente ativa, teve o menor teor de polifenóis, enquanto a fração com maior teor de polifenóis, foi mais ativa para estimular a produção de NO.

É importante mencionar que alguns polissacarídeos se destacam não só pela atividade imunoestimulante, mas também pela atividade antitumoral, em virtude do aumento da atividade citotóxica, tal como demonstrado para o polissacarídeo PCPw isolado e purificado a partir das raízes de *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel, que na dose de 100 mg/kg, promoveu inibição das células tumorais e melhorias significativas na anormalidade do sangue periférico e anemia no grupo tratado (LIU et al., 2013). De modo similar, o polissacarídeo SCPP11 da espécie *Schisandra chinensis* (Turcz.). Baill também apresentou atividade citotóxica contra células

tumorais *in vitro*, além de melhorias em parâmetros hematológicos e bioquímicos em determinadas concentrações, indicando ser este um potencial adjuvante contra o câncer e na produção de alimentos saudáveis (ZHAO et al., 2013).

O aumento desta atividade citotóxica, seja contra os micro-organismos, seja contra células tumorais, pode ser decorrente de uma série de mecanismos, tais como: ativação da atividade fagocítica, aumento das espécies reativas do oxigênio, aumento da produção de NO; e modulação da secreção de citocinas e quimiocina, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α e IFN- β (LENZI et al., 2013).

Resultados promissores também foram demonstrados para os polissacarídeos encontrados na alga marinha *Sargassum fusiforme* (Harv.) (CHEN et al., 2012a) e na erva *Solanum nigrum* L. (DING, et al., 2012), assim como para as arabinoxilanas do farelo de trigo (CAO et al., 2011). Cao e colaboradores (2011) demonstraram que as arabinoxilanas inibiram de modo significativo o crescimento de tumores transplantáveis e órgãos como timo e baço; correlacionando estes efeitos ao aumento da resposta imune promovido pelo aumento da atividade fagocítica, da proliferação de esplenócitos e células NK, da produção de IL-2, da reação de hipersensibilidade do tipo tardia e da proliferação de leucócitos periféricos.

Além dos polissacarídeos constantes nas espécies supracitadas, os polissacarídeos pertencentes à planta medicinal *T. occidentalis* tem assumido caráter de destaque na mediação da resposta imune celular e nos níveis de citocinas sobre as células metastáticas em modelos animais. Nesse caso, o experimento apresentado por Sunila, Hamsa & Kuttan (2011) demonstrou que tanto a fração rica em polissacarídeos quanto o extrato metanólico oriundo das partes aéreas dessa planta promoveram um aumento da atividade das células NK, da citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) e da citotoxicidade dependente do complemento (CDC) em células metastáticas, além de aumentar os níveis dos fatores antitumorais IL-2 e Inibidor Tecidual de Metaloproteínase (TIMP) e de diminuir os elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) no soro dos animais portadores de tumor metastático, quando comparado aos animais controle. Desse modo, o experimento sugeriu claramente a relevância de *T. occidentalis* e dos

seus polissacarídeos nos mecanismos imunológicos de redução da metástase em célula tumorais.

Ainda com relação à ação imunoestimulante e antitumoral, cabe ressaltar, que os polissacarídeos de outras origens também têm se destacado, tal como demonstrado para o cogumelo medicinal *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát (FAN et al., 2012), e para o polissacaropeptídeo extraído do cogumelo *Coriolus versicolor*, que tem sido utilizado como um adjuvante em quimioterapia e cujos efeitos antitumorais e imunomoduladores tem justificado a sua intervenção eficaz na segmentação de tumores. No experimento conduzido por Sekhon et al. (2013), o polissacaropeptídeo aumentou significativamente o número de monócitos, porém com discreta alteração na proliferação de células NK e linfócitos B e T. Estes estudos reforçam a correlação do aumento da resposta imune com a atividade antitumoral; e apontam também a importância dos polissacarídeos imunomoduladores originados de cogumelos.

Conforme relatado por Ren; Perera & Hemar (2012), os polissacarídeos, polissacarídeos-peptídeos, e complexos de polissacarídeos e proteínas isolados de cogumelos têm demonstrado diversas propriedades terapêuticas, dentre elas, a atividade imunomoduladora, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante, além de exercer efeitos redutores sobre os níveis de colesterol no sangue. De modo que, alguns destes compostos têm sido comercializados sobretudo para terapias anticâncer, a exemplo do Krestin®, obtido do cogumelo *Trametes versicolor*.

Além de serem considerados agentes imunomoduladores promissores, a maioria dos polissacarídeos derivados de plantas medicinais são atóxicos (YUAN et al., 2008; XIA et al., 2012; XU et al., 2012) e sem efeitos colaterais significativos (NGUYEN et al., 2012; XIA et al., 2012; XU et al., 2012), o que é um problema grave associado com polissacarídeos imunomoduladores bacterianos e compostos sintéticos (XU et al., 2012). A aplicação de lipopolissacarídeos (LPS) como um adjuvante imune, por exemplo, tem sido dificultado pela sua toxicidade relacionada ao lipídeo A, componente que é responsável por indução de febre, iniciação da cascata do complemento, coagulação de sangue, e possivelmente choque endotóxico (YUAN et al., 2008). Tais resultados respaldam, portanto, a potencial

aplicação dos polissacarídeos enquanto novos potenciais imunomoduladores.]

3.5.2.2 Polifenóis

Os polifenóis representam uma ampla classe de compostos com um ou mais grupamentos hidroxilas diretamente ligados a um anel aromático, sendo os flavonoides, um dos seus grupos mais representativos (SANTOS, 2010). Nos últimos anos, estes compostos têm assumido relevante importância no pronunciamento da resposta imune, somando-se à ampla diversidade terapêutica descrita na literatura. Pesquisas recentes têm demonstrado o efeito imunoestimulante de frações ricas em flavonoides (NWORU et al., 2010), assim como vários tipos de flavonoides têm sido reconhecidos pelas suas atividades imunomoduladoras, incluindo a apigenina, proantocianidinas oligoméricas, isoflavonoides, flavonas e antocianidinas; todos encontrados em *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn (KUMAR et al., 2012).

Estudos imunomoduladores com quercetina, rutina, daidzina e ácido clorogênico, extraídos de uma fração bioativa da cereja ácida *Prunus cerasus* (PNRS-EtOAC), foram realizados *in vivo* com camundongos, sendo detectado efeito imunoestimulante de PNRS-EtOAC de forma dose dependente através de estímulo na produção de IgM e IgG em reação de hipersensibilidade do tipo retardada (DTH); de aumento da resposta imune celular e humoral, com maior concentração de citocinas (IFN- γ , IL-4 e TNF- α) no soro; e da proliferação de linfócitos T na dose de 50 mg/kg (ABID et al., 2012).

Mecanismos similares foram evidenciados em um estudo realizado em frangos, com o polissacarídeo obtido de *Herba epimedii* e com a flavona oriunda da própolis, administrados uma vez por dia durante três dias sucessivos. Estes compostos mostraram efeito imunopotencializador, com aumento significativo da concentração de IgG, IgM, IFN- γ e IL-6, promovendo assim a proliferação de linfócitos, frente à imunossupressão induzida por ciclofosfamida (FAN et al., 2013).

Por sua vez, no estudo realizado com as frações aquosas de *U. tomentosa*, compostas por polissacarídeos, derivados cafeoilquínicos e flavonoides, tais como

rutina, promoveu ativação *in vitro* dos macrófagos, aumento nos níveis de TNF- α e IL-6 e redução dos níveis de IL-1 β (LENZI et al., 2013).

Krifa et al. (2013) estudaram nas células de camundongos os efeitos dos flavonoides, polifenóis e taninos do extrato aquoso de *Limoniastrum guyonianum* Boiss. Os resultados mostraram que esses metabólitos apresentaram potencial atividade imunomoduladora, sendo os flavonoides, caracterizados como galocatequina, epigallocatequina e epigallocatequina-3-O-galato.

Além dos flavonoides, as cumarinas e seus glicosídeos também tem exercido função imunomoduladora, sendo responsáveis pela atividade de *Achillea millefolium* C. Koch, *Heracleum persicum* Desf.; e *Citrus natsudaoidai* Hayata. Verifica-se ainda a importância terapêutica dos seus derivados, como a esculetina (6,7-dihydroxycoumarin), um composto que pode ser isolado a partir de muitas plantas de interesse imunoestimulante, como *Artemisia capillaries* Thunb., *Citrus limonia* Osbeck e *Euphorbia lathyris* L. (KUMAR et al., 2012).

3.5.2.3 Outros grupos de metabólitos

Com relação à participação de outros grupos químicos na atividade imunoestimulante, têm-se os glicosídeos, encontrados na forma de glicosídeos iridoides, tais como relatado em *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell; glicosídeos de antraquinona, em *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall ex Ness; glicosídeos feniletanóides em *Ligustrum purpurascens* Y.C. Yang (SONG et al., 2012); e glicosídeos sesquiterpenos em *Dendrobium nobile* Lindl (KUMAR et al., 2012).

Além dos glicosídeos, também encontram-se relatos científicos acerca da atividade imunoestimulante das sapogeninas, tais como saponinas triterpenoides e os diterpenos, a exemplo de *Gymnema sylvestre* R. Br., *Chlorophytum borivilianum* Sant. F, *Boswellia* spp. e *Randia dumetorum* Lamk. (KUMAR et al., 2012). Alguns constituintes, inclusive, têm sido utilizados como adjuvantes da resposta imune em vacinas naturais e sintéticas, a exemplo das saponinas isoladas de *Quillaja saponária* Molina, dada à sua provável capacidade de induzir a produção de

citocinas. Como exemplo, o complexo imunoestimulante formado pela saponina purificada Quil A, colesterol, fosfolipídios e antígeno anfipático, são capazes de induzir forte a resposta Th1 e Th2 (subpopulações de linfócitos T CD4+), além de terem boa liberação (MOTA; LIMA; MELO, 2006).

A fração de terpenos também apresenta ação imunomoduladora, a exemplo do monoterpene eugenol a partir de *Ocimum sanctum* L.; dos diterpenos de *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees, *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan., e *Alternanthera tenella* Colla; dos triterpenos de *Ganoderma lucidum* (FR.) Karst.; e dos triterpenos lupeol e amirina em *Bauhinia variegata* L. (KUMAR et al., 2012).

No estudo de Cech et al. (2010), os extratos e as alquilamidas isoladas, especialmente Dodeca-2E, 4E- isobutilamida do ácido dienoico, de *E. purpurea* suprimiram a produção de TNF- α e Prostaglandina E2 (PGE2) das células inflamatórias infectadas pela influenza A H1N1 e inibiram fortemente a produção de citocinas e quimiocinas, como fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF); quimiocina ligante 2 (CCL2), previamente denominada *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1); quimiocina ligante 3 (CCL3), previamente denominada *macrophage inflammatory protein-1-alpha* (MIP-1 α); e quimiocina ligante 5 (CCL5), previamente denominada RANTES (*regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*).

Além disso, no trabalho de Maurya et al. (2012), dois triterpenos, o ácido ursólico e o lupeol, foram isolados a partir de *Eucalyptus tereticornis* Sm. e *Gentiana kurroo* (Royle); e foram submetidos a estudos de modelagem *in silico* QSAR e de acoplamento, com resultados confirmados *in vivo*. Os resultados de acoplamento sugeriram que os dois triterpenos poderiam exercer atividade como moduladores imunológicos e anti-inflamatórios, devido a elevada afinidade de ligação com receptores humanos viz., fator nuclear kappa B p50 (NF- κ B p50), fator nuclear kappa B p52 (NF- κ B p52), TNF- α e cicloxigenase-2 (COX-2). *In vivo*, os triterpenos mostraram ainda aumentos significativos na função imune humoral, embora não tenham sido observadas alterações significativas na resposta mediada por células e parâmetros hematológicos.

Dentre os demais grupos químicos de metabólitos vegetais que corroboram com esta atividade, estão alguns exemplos de alcaloides, presentes em *Achillea millefolium* L. *Murraya koenigii* (L.) Spreng., *Cissampelos Pareira* L. e *Actinidia macrosperma* C. F. Liang (KUMAR et al., 2012); a glucosamina, um aminosacarídeo isolado do extrato aquoso da folha de *Azadirachta indica* A. Juss (KUMAR et al., 2012); o constituinte do óleo da semente de *Mesua ferrea* L., denominado mesuol, usado em formulações Ayurvédicas para melhorar a imunidade (CHAHAR et al., 2012); e a zingerona, uma alcanona fenólica extraída de *Zingiber officinale* recomendada como suplemento alimentar e como imunoestimulante em camarões brancos do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (CHANG et al., 2012).

Diversos trabalhos demonstram ainda o potencial de determinados metabólitos de espécies vegetais em aquicultura, tal como relatado para os derivados de ácido caféico, frações de polissacarídeos e alcanidas presentes em *Echinacea purpurea* (L.), e por meio dos glicosídeos do ácido quinóico e dos alcaloides pentacíclicos oxíndoles em *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (MEDINA-BELTRÁN et al., 2012). Ademais, recentemente, Kumar et al. (2013) relatou a presença de respostas imunes específicas em peixes dourados *Carassius auratus* e resistência contra as bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila* associados a Azadirachtina, um triterpenoide derivado da planta indiana *Azadirachta indica* A. Juss.

Além da suplementação de animais aquáticos, alguns extratos vegetais e metabólitos têm sido aplicados em suplementação de aves. Lee; Titan & Yu (2011), por exemplo, sugerem a utilização do extrato do cogumelo *Pleurotus eryngii* (Eringi), composto por polissacarídeo bruto, adenosina e triterpenos, como suplemento para imunidade de frangos (LEE; TITAN; YU et al., 2011).

3.6 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As técnicas utilizadas para extração de polissacarídeos a partir de plantas incluem extração aquosa sob aquecimento, extração por fluido supercrítico, extração

assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom (ZENG et al., 2015). Dentre elas, a extração aquosa sob aquecimento é a tecnologia mais comumente utilizada (HUANG; NING, 2010; SUN et al., 2011) devido ao baixo custo, simplicidade e facilidade para industrialização (TANG et al., 2011), quando comparado às demais técnicas que envolvem custos mais elevados e que não são favoráveis para a industrialização e ampliação, sendo técnicas atualmente mais limitadas para laboratório (TANG et al., 2011).

A extração aquosa sob aquecimento consiste em colocar a droga vegetal em contato com água para aquecimento em banho maria numa temperatura e intervalo de tempo previamente estabelecidos (JIANG et al., 2010; TANG et al., 2011; TIAN et al., 2011; YE; JIN et al., 2012; LUO et al., 2012). Contudo, vale ressaltar que a duração de tempo da extração é longa e que o rendimento dos polissacarídeos pode ser afetado pelas altas temperaturas empregadas, conforme pode ser observado na Tabela 1 (HUANG; NING, 2010; TANG et al., 2011; ZENG et al., 2015). Isso ressalta a importância da avaliação e controle dos parâmetros que podem afetar esse rendimento, quais sejam: proporção droga: solvente, temperatura e tempo de extração (SUN et al., 2011; JIN et al., 2012).

Tabela 1- Parâmetros de extração de polissacarídeos de plantas medicinais

Espécie vegetal	Proporção droga:solvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Referência
<i>Ginkgo biloba</i>	1:30	80	3,5	Jiang et al, 2010
<i>Sarcandra glabra</i>	1:30	85	3,0	Jin et al, 2012
<i>Dioscorea nipponica</i>	1:33	95	2,14	Luo et al, 2012
<i>Morus alba</i>	1:24	70	1,5	Tang et al, 2011
<i>Paeonia sinjiangensis</i>	1:8	85	1,5	Tian et al, 2011
<i>Plantago asiatica</i>	1:24	91	3,9	Ye; Jiang, 2011

3.7 DOSEAMENTO DE POLISSACARÍDEOS

Em virtude do potencial terapêutico dos polissacarídeos, e das necessidades normativas para regularização de fitoterápicos, verifica-se a importância de métodos analíticos precisos, rápidos e fidedignos que possam ser usados rotineiramente no controle de qualidade de insumos vegetais cujos compostos bioativos sejam os polissacarídeos (LEYVA et al., 2008).

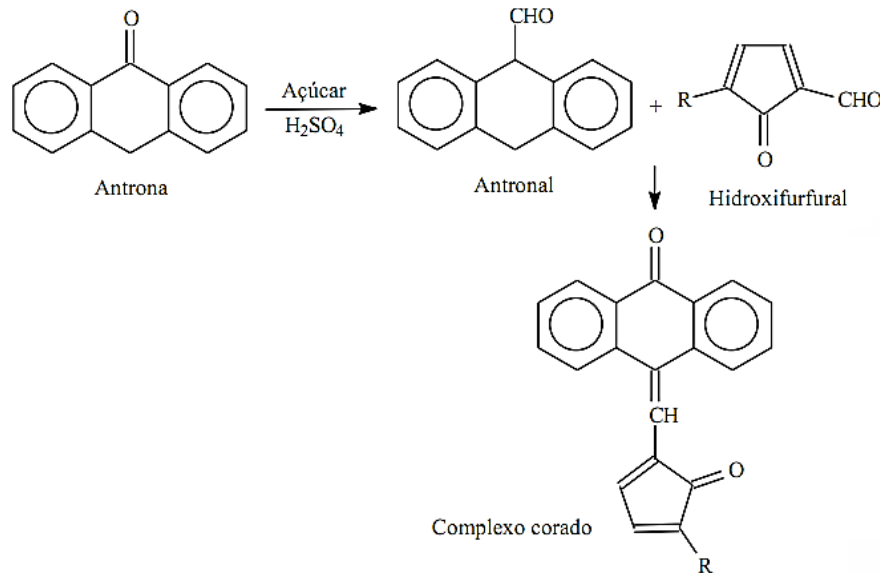
Segundo Martens & Frankenberger (1993) a análise para detecção de polissacarídeos possui uma complexidade inerente à sua natureza química; podendo ser determinados por cromatografia gasosa (CG), após derivatização; por espectrofotometria (Métodos de Antrona, Fenol-sulfúrico e Somogyi-Nelson) (SILVA et al., 2003), após tratamento com reagentes cromogênicos (MARTENS & FRANKENBERGER, 1993) e ainda por métodos titulométricos (Métodos de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, *Lane-Enyon* e *Luff-Schoorl*) e gravimétricos (Método de *Musson-Walker*). Contudo, os métodos colorimétricos destacam-se (MARTENS & FRANKENBERGER, 1993; SILVA et al., 2003), em virtude da simplicidade, rapidez e por não requererem instrumentação de alto custo.

Dentre os métodos colorimétricos, o método da antrona figura como uma das técnicas de quantificação mais utilizadas e eficientes (MARTENS & FRANKENBERGER, 1993; LEYVA et al., 2008), tendo sido aplicado com êxito na determinação de açúcares solúveis em diferentes amostras vegetais, embora possua uma série de etapas e exista uma grande variabilidade dos parâmetros descritos em cada estudo (YEMM & WILLIS, 1954; DONG et al., 2003; DONG et al., 2006; LEYVA et al., 2008; TANG et al., 2011; TIAN et al., 2011).

A reação de antrona se baseia na ação hidrolítica e desidratante do ácido sulfúrico (H_2SO_4) sobre os carboidratos. Após hidrólise das ligações glicosídicas, os açúcares simples são desidratados para furfural ou hidroximetilfurfural; e consequentemente, estas substâncias se condensam então com a antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) (Figura 1) (SILVA et al., 2003; Olennikov & Tankhaeva, 2006), formando produtos de coloração verde-azulada, com absorção máxima entre

520-625 nm.

Figura 1 - Reação de complexação da antrona com carboidratos.



Fonte: Silva (2012)

Essa reação foi primeiramente descrita como um teste qualitativo por *Dreywood* em 1946, tendo sido posteriormente estendida como método conveniente e específico para a estimativa colorimétrica de diferentes carboidratos (SCOTT & MELVIN, 1953; YEMM & WILLIS, 1954; HANSEN & MOLLER, 1975), empregando-se geralmente a glicose como padrão, uma vez que as cores produzidas por diferentes sacarídeos têm espectros de absorção semelhantes (TOENNIES & KOLB, 1964), de modo que diversos autores têm demonstrado ao longo dos anos que estimativas bastante precisas de açúcares totais podem ser obtidas sem requerer a determinação separada dos constituintes (SCOTT & MELVIN, 1953; YEMM & WILLIS, 1954; ROE & DAILEY, 1966; HALHOUL & KLEINBERG, 1972).

Assim, este método tem sido aplicado com êxito na determinação de açúcares em diferentes amostras, dentre elas, as amostras vegetais; embora ainda seja verificado na literatura um grande número de etapas e uma grande variabilidade dos parâmetros descritos (YEMM & WILLIS, 1954; DONG et al., 2003; DONG et al.,

2006; LEYVA et al., 2008; TANG et al., 2011; TIAN et al., 2011).

3.8 RADICAIS LIVRES E IMPLICAÇÕES PATOLÓGICAS

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais energético e que possuem existência independente. Estas espécies podem ser formadas de três maneiras distintas, a saber: perda de um elétron de uma molécula não radicalar (equação 1); ganho de um elétron por uma molécula não radicalar (equação 2); e fissão homolítica de uma ligação covalente (equação 3) (MATTOS, 2009).



Diferentes espécies de radicais livres podem ser produzidas no organismo, tais como radicais de carbono, de enxofre, de nitrogênio e de oxigênio, destacando-se as espécies reativas de oxigênio (EROs) pela sua abundância e alta reatividade (MATTOS, 2009). As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos, sendo geradas naturalmente pelo processo metabólico normal (BARBOSA, 2008; CHEN et al., 2014). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, sob a forma de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARBOSA, 2008).

Os radicais livres atuam, portanto, como mediadores de transferência de elétrons em várias reações bioquímicas (ALVES et al., 2010), estando envolvidos na regulação da transdução de sinal e expressão gênica, ativação de receptores

(CHEN et al, 2014), produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (ALVES et al., 2010). Eles desempenham ainda um papel vital na fagocitose (CHEN et al., 2014).

Por outro lado, ainda que possuam diferentes papéis no organismo, radicais livres em excesso são capazes de causar danos a moléculas de DNA, proteínas, carboidratos, lipídios e organelas celulares, provocando alterações nas suas estruturas e funções e, dessa forma, se encontram diretamente envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos de inúmeras patologias, sobretudo, de doenças crônicas não transmissíveis e degenerativas (ALVES et al., 2010; CHEN et al., 2014; MORAIS et al., 2013), incluindo câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose (BARBOSA, 2008; SHEN et al., 2014), asma, artrite reumatoide, perturbações da função imunológica (CHEN et al, 2014), demência senil, esclerose múltipla e até o envelhecimento precoce (BARBOSA, 2008).

Além do mais, a produção excessiva de radicais livres, associada com inflamação, leva a uma condição de estresse oxidativo (VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004). O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica complexa que envolve uma elevada concentração de diferentes espécies radicalares e vários mecanismos que causam danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (SANTANA et al., 2013); sendo considerado o principal fator contribuinte para as altas taxas de mortalidade associadas com diversas doenças, tais como choque séptico (VICTOR; ROCHA; DE LA FUENTE, 2004). O estresse oxidativo também pode afetar a função das células imunes e imunidade (DE LA FUENTE; VITOR, 2000), por diferentes mecanismos, tais como pela ativação do NF- κ B, que por sua vez regula a expressão de genes envolvidos na produção de várias citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, entre outros (KNIGHT, 2000).

Vale ressaltar que além da geração normal de radicais livres, diversas situações não-fisiológicas também podem levar à sua formação. Dentre elas, figura a exposição das células ou indivíduos a diferentes condições como radiação, poluição, fumo, estresse e inflamação tecidual local, sendo então de fundamental

importância a busca por novos compostos naturais e/ou sintéticos capazes de proteger o organismo contra os efeitos deletérios provocados pelos radicais (BARBOSA, 2008; COSTA et al., 2012).

3.9 ANTIOXIDANTES

Para combater os radicais livres os organismos vivos dispõem de um sistema de defesa antioxidante, constituído por substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2012). Os antioxidantes podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (BARBOSA, 2008).

De modo geral, as células possuem um sistema de defesa que atua em duas linhas: (1) ação detoxificativa do agente antes que ele cause lesão - sistema constituído pelas enzimas glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e também pela vitamina E; e (2) reparo da lesão ocorrida - constituída pelo ácido ascórbico, glutathione-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px, entre outros (BARBOSA, 2008).

Quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, com predominância da formação de radicais livres frente a remoção dos mesmos pelos sistemas de defesa antioxidante, o organismo sofre ações degenerativas através do distúrbio conhecido como estresse oxidativo (ALVES et al., 2010; NASSER et al., 2011; COSTA et al., 2012). O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica complexa que envolve uma elevada concentração de diferentes espécies radicalares e vários mecanismos que causam danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (SANTANA et al., 2013).

Uma alternativa para proteção do organismo contra o estresse oxidativo, envolve a atuação de compostos antioxidantes obtidos de fonte externa, como alimentos e bebidas (ALVES et al., 2010). O consumo de vitaminas e polifenóis

presentes em muitas frutas e legumes, por exemplo, tem demonstrado uma atuação antioxidante preventiva contra doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (HEO, 2014).

Por esse motivo, e em virtude de diversas doenças serem associadas a um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e antioxidantes (MORAIS et al., 2013), somado ao fato de que terapêutica farmacológica atual para o tratamento de diversas doenças como Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla, pode ser realizada devido às propriedades antioxidantes de muitos compostos, a busca por novos agentes naturais e/ou sintéticos com ação antioxidante tem sido um importante objeto de estudo pela indústria farmacêutica (COSTA et al., 2012).

Seguindo essa tendência, as propriedades antioxidantes de extratos vegetais e/ou produtos isolados de plantas medicinais tem despertado amplo interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em diferentes produtos (SANTANA et al., 2013). Como consequência diversos estudos têm demonstrado a eficácia dos extratos vegetais, sendo a atividade atribuída a componentes específicos ou classes de componentes (BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014), produzidos através do seu metabolismo secundário. Atribui-se à presença de óleos essenciais (BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014), polissacarídeos (CHEN et al., 2014; SHEN et al., 2014) e de compostos fenólicos, com destaque aos flavonoides (BARBOSA, 2008; DENG et al., 2014; HEO et al., 2014).

Embora os flavonoides sejam tradicionalmente conhecidos devido à sua ação antioxidante, os polissacarídeos naturais têm atraído grande atenção (SHEN et al., 2014), pela atuação como sequestradores de radicais livres. Segundo Chen e colaboradores (2014), o grupo hidroxila dos polissacarídeos pode desempenhar um importante papel na manutenção da sua capacidade de doar hidrogênio, resultando em um bom potencial antioxidante (CHEN et al., 2014).

Diante deste cenário, estudos sobre radicais livres e desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (ALVES et al., 2010). A seguir serão discutidos abordados alguns dos métodos tradicionalmente empregados nessa avaliação.

3.10 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os métodos para avaliação da atividade antioxidante propostos na literatura são diversos (SUCUPIRA et al., 2012). Dentre eles, os testes *in vitro* tratam-se de ferramentas usuais para auxiliar pesquisadores na seleção inicial de plantas medicinais para estudos químicos e farmacológicos mais avançados, bem como na seleção de substâncias de origem sintética ou isoladas de produtos naturais que possam ser utilizadas como fármacos. Isto porque um composto que exibe baixa atividade antioxidante *in vitro* provavelmente exibirá pouca atividade *in vivo* (ALVES et al., 2010).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* são numerosas (SUCUPIRA et al., 2012), mas de um modo geral podem ser classificadas em dois grupos: os ensaios para medir a habilidade de sequestro de radicais livres, e os ensaios para avaliar peroxidação lipídica, no qual um lipídio ou substrato lipoproteico sob condições padrão é usado, e o grau de inibição da oxidação é medido (ALVES et al., 2010).

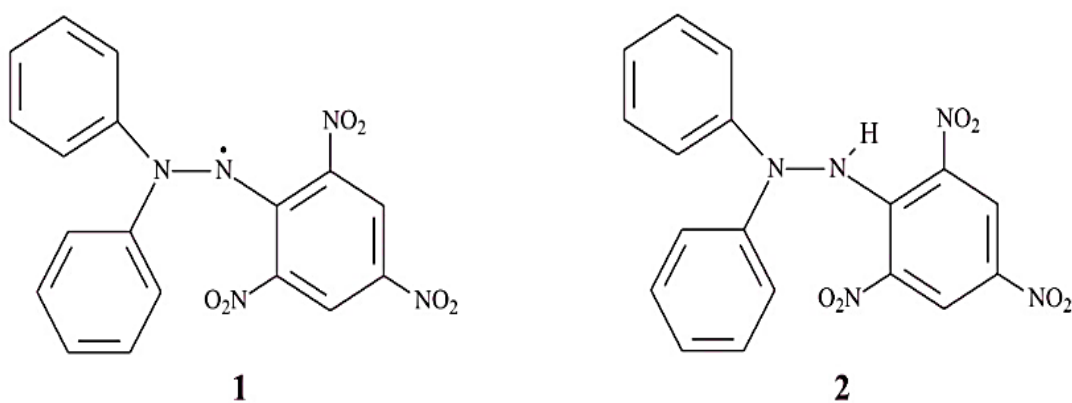
A diversidade de metodologias gera resultados numéricos difíceis de serem comparados (MORAIS et al., 2013), pois além de estarem sujeitas a interferências (SUCUPIRA et al., 2012), os mecanismos antioxidantes se mostram diferentes, de forma que dificilmente haverá um único método capaz de avaliar a capacidade antioxidante de uma substância de forma segura e com precisão (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2012; MORAIS et al., 2013). Dessa forma, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio isoladamente é capaz de refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (BARBOSA, 2008; SUCUPIRA et al., 2012).

3.10.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

O método de DPPH• é um método espectrofotométrico utilizado para avaliar a

capacidade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato via atividade sequestradora do radical livre DPPH• (SUCUPIRA et al., 2012). O DPPH• é um radical de nitrogênio orgânico estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula (Figura 2). Esta deslocalização confere ao DPPH• uma coloração violeta (ALVES et al., 2010), caracterizada por uma banda de absorção na faixa de 515-520 (SUCUPIRA et al., 2012).

Figura 2 - Estrutura molecular radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH•.



Fonte: Alves (2010)

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH•, reduzindo-o a 2,2-difenil-1-picril-hidrazina, um composto de coloração amarela (Figura 2) (ALVES et al., 2010). Assim, quando uma substância antioxidante é adicionada a uma solução alcoólica de DPPH•, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES et al., 2010; DU et al., 2014; SHEN et al., 2014), de tal modo que a redução do radical DPPH• é monitorada pelo decaimento da absorvância (SUCUPIRA et al., 2012). A partir dos resultados obtidos determina-se então a percentagem de sequestro de radicais livres e de atividade antioxidante (BORGES et al., 2011).

Do ponto de vista metodológico, este método é considerado um dos mais

fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides (ALVES et al., 2010), apresentando as vantagens de não envolver condições drásticas de temperatura e oxigenação (BORGES et al., 2011), e do DPPH• estar disponível comercialmente, o que facilita seu uso e evita sua geração por distintas formas, como ocorre com outros métodos (SUCUPIRA et al., 2012).

3.10.2 Sequestro do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS^{•+})

O método do ABTS^{•+} é um método espectrofotométrico empregado para avaliar a habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS^{•+}. O ABTS^{•+} é um composto cromóforo produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS), através de reações químicas, eletroquímicas ou enzimáticas (BORGES et al., 2011). Sua obtenção pela reação do ABTS com persulfato de potássio, leva a formação de um meio reacional com coloração azul esverdeada, e absorção máxima nos comprimentos de onda de 645, 734 e 815 nm (SUCUPIRA et al., 2012).

A adição de um antioxidante promove a redução do ABTS^{•+} a ABTS levando a perda da coloração do meio reacional, que é monitorada pelo decréscimo da absorvância através de espectrofotometria. Portanto, com a perda de cor, a percentagem de inibição do ABTS^{•+} pode ser determinada em função do Trolox®, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante (SUCUPIRA et al., 2012).

A vantagem do método consiste na sua relativa simplicidade, o que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório (BORGES et al., 2011). Apresenta ainda excelente estabilidade, sendo um dos testes de captura de radical mais rápidos para avaliação de atividade antioxidante, bem como oferece resultados reprodutíveis e uma boa solubilidade, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica

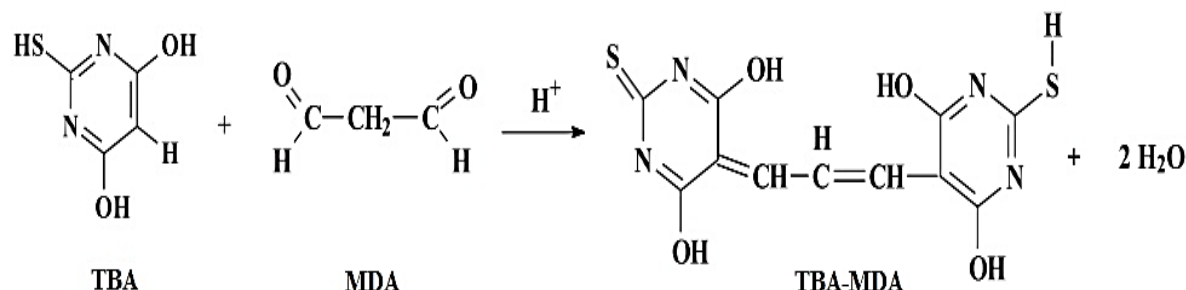
como hidrofílica, compostos puros e extratos vegetais (BORGES et al., 2011; SUCUPIRA et al., 2012).

3.10.3 Inibição da peroxidação lipídica – método de determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A análise da formação de TBARS figura dentre os principais métodos utilizados para mensurar o estresse oxidativo de tecidos e células, atuando através da quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica (NETO; MACEDO, 2011). De modo geral, a peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares. O processo é iniciado pela reação de um radical livre e propagada por radicais peroxilas numa reação em cadeia, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados e utilizados para avaliar o estresse oxidativo (LIMA & ABDALLA, 2001).

O teste de determinação de TBARS é um método para marcação de peroxidação lipídica que se baseia na quantificação do malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, formado durante o processo oxidativo. A reação envolve o ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA, produzindo um complexo de coloração rósea, o TBA-MDA (Figura 3), que pode ser determinado por absorção no visível (532 nm) (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005), ou por fluorescência a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão (NETO et al., 2012).

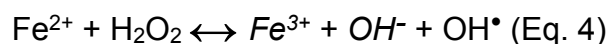
Figura 3 - Reação do método de determinação de TBARS entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e o malonaldeído (MDA).



Fonte: Osawa; Felício; Gonçalves (2005)

3.10.4 Sequestro do radical OH[•] – ensaio da desoxirribose

O princípio deste ensaio é a quantificação do produto de degradação da 2-desoxirribose quando exposto ao radical OH[•] (SANTANA et al., 2013). O radical OH[•] é gerado através da reação de Fenton, a partir de uma mistura contendo Fe³⁺ e H₂O₂, conforme demonstrado na equação 4. Se a mistura resultante for aquecida em condições ácidas, o radical oxida a 2-desoxirribose, formando o MDA, que por sua vez pode ser detectado espectrofotometricamente por sua habilidade em reagir com o TBA, formando um cromóforo róseo (BARBOSA, 2008), com absorção em 532 nm (SCHULDT, 2005).



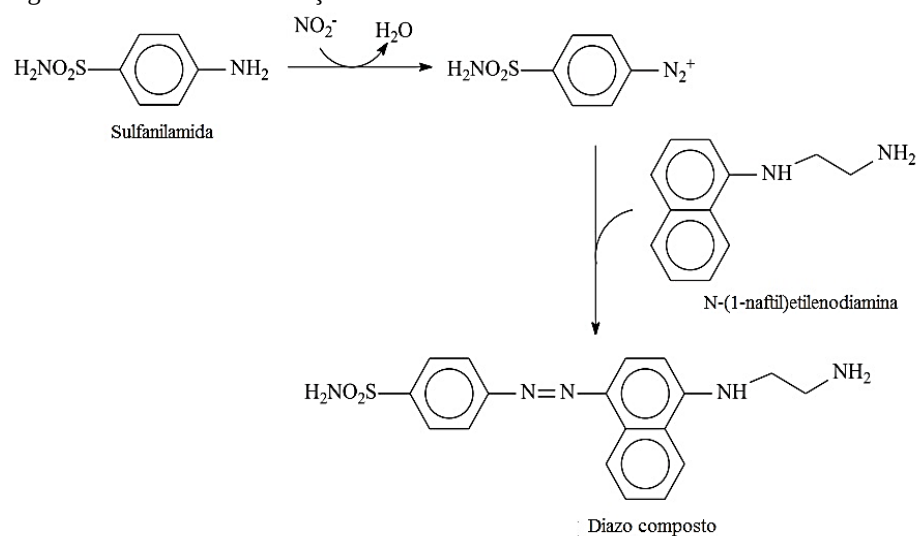
Qualquer composto adicionado na mistura reacional capaz de reagir com o radical OH[•] poderá competir com a desoxirribose por este radical, diminuindo assim a degradação deste açúcar e formação de MDA (BARBOSA, 2008). Portanto, quanto maior a capacidade antioxidante do composto testado, menor é a intensidade da cor (SCHULDT, 2005).

3.10.5 Sequestro do NO

A avaliação do sequestro do NO *in vitro* pode ser realizada através do procedimento espectrofotométrico baseado da reação de Griess (MAIA et al., 2010). Este método envolve a formação íons nitrito a (NO_2^-) partir da interação do NO com o oxigênio, e a formação de um cromóforo durante a reação do (NO_2^-) com o reagente de Griess (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e N-1-naftiletilenodiamina 0,1% em água). A figura 4 representa um mecanismo de reação usada no método de Griess, em que o NO sofre diazotação com a sulfanilamida, formando um sal de diazônio, com subsequente complexação com a N-(1-naftil) etilenodiamina, formando-se um composto rosa que possui um espectro de absorção característico a 546 nm e que pode ser quantificado por espectrofotometria (BASU & HAZRA, 2006; MAIA et al., 2010).

Portanto, de forma similar ao ensaio da desoxirribose, qualquer composto adicionado na mistura reacional capaz de reagir com o radical NO poderá competir com o reagente de Griess, impedindo com isso a formação do cromóforo detectado por espectrofotometria (MAIA et al., 2010).

Figura 4 - Mecanismo de reação do método de Griess.



Fonte: Ramos (2006)

4. Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

Foram utilizadas amostras das partes aéreas de *T. occidentalis* coletadas no município do Cabo de Santo Agostinho - PE (8°29'86,07"S e 35°06'45,29"W), no mês de janeiro de 2013. Dentre os parâmetros para a coleta do material, foram selecionadas partes aéreas em igual estágio de desenvolvimento e com ausência de depredação. A identificação foi realizada pela pesquisadora e curadora Dra. Rita de Cássia Araújo Pereira e a exsicata depositada no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob o nº 87.752.

4.1.1 Obtenção da droga vegetal (estabilização, secagem e pulverização)

O material vegetal fresco foi lavado com água purificada e aspergido com álcool a 70% (v/v). Em seguida, foi pesado e colocado em estufa de ar circulante (Fabbe-Primar®) por 84 h a 40°C. Após secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas (Adamo® modelo 340) com tamis de 20 mesh (0,84 mm), pesado e acondicionado em recipiente de vidro, devidamente vedado e mantido em ausência de luz. No que diz respeito ao seu perfil fitoquímico, foi evidenciado por Figueirêdo (2014) a presença de flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e esteroides; além da ausência de taninos, cumarinas e alcaloides, durante um ano de avaliação sazonal (maio/2011 a abril/2012), previamente realizada no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM.

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE POLISSACARÍDEOS TOTAIS DAS PARTES AÉREAS DE *T. occidentalis*

O método analítico para doseamento dos polissacarídeos totais de *T.*

occidentalis descrito por Marques e colaboradores (2014), foi validado, visando garantir sua reprodutibilidade nas demais etapas do trabalho, fazendo uso da droga vegetal, matérias-primas e procedimentos apresentados a seguir.

4.2.1 Matérias-primas

Foram utilizados o álcool etílico P.A (Quimex®), o TCA (Vetec®), o H₂SO₄ (Proquímico s®). As substâncias antrona e padrão de glicose foram utilizadas da marca Sigma Aldrich®.

4.2.2 Reagente da antrona

O reagente de antrona foi preparado utilizando-se uma concentração de 0,2% (p/v) de antrona, em uma mistura de H₂SO₄ e água, com proporção de 6:1.

4.2.3 Obtenção da solução extrativa

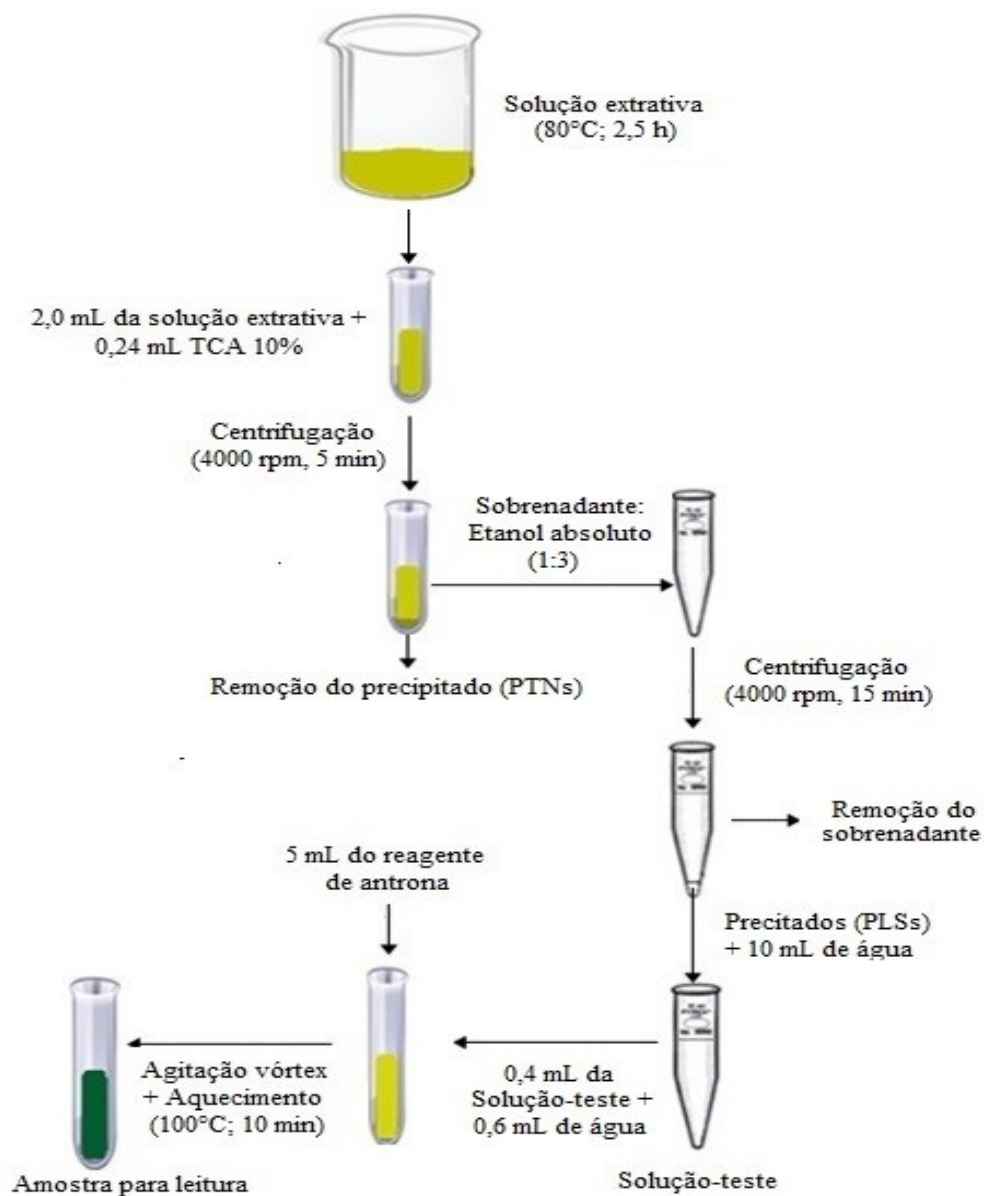
A solução extrativa foi obtida através de extração aquosa sob aquecimento, baseando-se em metodologias e parâmetros de extração validados pelo grupo. A extração foi realizada em banho-maria, empregando-se 3,0 g do material vegetal e 30 mL de água destilada, durante 2,5 h e temperatura de 80°C. A solução extrativa foi resfriada à temperatura ambiente (25°C) e filtrada em algodão.

4.2.4 Método geral para obtenção de solução aquosa de polissacarídeos (solução-teste)

As soluções-teste foram obtidas conforme os seguintes parâmetros: utilizou-se uma alíquota de 2,0 mL da solução extrativa e de 0,24 mL de TCA 10% (v/v).

Logo após, as amostras foram centrifugadas, em Centrífuga Excelsa 2, Fanen®, a 4000 rpm, durante 5 min para remoção de interferentes proteicos e tratamento do sobrenadante com etanol absoluto, na proporção 1:3. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 15 min para precipitação dos polissacarídeos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os polissacarídeos dissolvidos em água destilada (10 mL) (Figura 5).

Figura 5 - Método geral para obtenção da solução-teste e doseamento dos polissacarídeos totais (Método de antrona).



Fonte: Autor

4.2.5 Método geral para doseamento dos polissacarídeos totais (método de antrona)

O doseamento dos polissacarídeos totais foi realizado em espectrofotômetro (UV/Vis-mini-1240, Shimadzu®), empregando-se as soluções-teste obtidas a partir da solução extrativa de *T. occidentalis* (Figura 5); e o método de antrona. Utilizou-se também água destilada para obtenção da solução de compensação (branco) e amostras diluídas de uma solução de glicose 100 µg/mL para construção da curva padrão, no intervalo de 20-100 µg/mL, conforme descrito na Tabela 2. Uma alíquota de 5,0 mL do reagente de antrona foi adicionado a tubos contendo 1,0 mL de água destilada para obtenção do branco; 1,0 mL das amostras diluídas de glicose (Tabela 2) para obtenção da curva-padrão e 1 mL das soluções diluídas de polissacarídeos de *T. occidentalis* (0,4 mL da solução-teste e 0,6 mL de água) para obtenção das amostras para leitura (Figura 5). Após agitação em vórtex MA 162 Marconi®, e aquecimento por 10 min, em banho-maria Novaética® a 100°C, determinou-se a absorvância das amostras no comprimento de onda de 625 nm (Figura 5).

Tabela 2- Obtenção da curva padrão de glicose para determinação do teor de polissacarídeos de *T. occidentalis*.

Glicose (µg)	Solução de glicose 100 µg/mL (mL)	Água destilada (mL)
100	1,0	0,0
80	0,8	0,2
60	0,6	0,4
40	0,4	0,6
20	0,2	0,8

4.2.6 Validação do método analítico

Para validação do método foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, e robustez. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a confiabilidade dos

parâmetros foi verificada pelo coeficiente de variação percentual (CV%), não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003), embora para material vegetal seja permitido aceitar uma dispersão de 15 % (BRASIL, 2013). Adicionalmente, os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) *One-Way* ou *Two-Way*, quando aplicável, com um nível de significância de 95%.

4.2.6.1 Especificidade

A especificidade do método foi verificada através da sobreposição dos espectros das amostras da solução-teste com e sem adição do reagente de antrona, e dos padrões de glicose e quercetina, após adição do reagente, obtidos no intervalo de comprimento de onda compreendido de 420 a 700 nm.

4.2.6.2 Linearidade, limites de detecção e quantificação

A linearidade foi verificada para solução extrativa e para solução-teste, a partir da análise de três curvas autênticas. Para a solução extrativa, três curvas foram construídas com amostras da solução extrativa, em cinco níveis de concentração: 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 e 0,3 g/mL, correspondendo a um intervalo de 50 a 150%. Para a solução-teste, três curvas foram construídas com cinco alíquotas da solução-teste: 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mL, correspondendo a um intervalo de 50 a 150%. As curvas foram construídas empregando-se os valores médios da absorvância em função da concentração. Os resultados foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), adotando $R^2 > 0,99$ como valor mínimo para aceitação (BRASIL, 2003), embora para material vegetal possa ser adotado $R^2 > 0,98$ (BRASIL, 2013). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações $LD = DP_a \times 3/IC$ e $LQ = DP_a \times 10/IC$, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, obtido das três curvas de

linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas (BRASIL, 2003).

4.2.6.3 Robustez

O ensaio para determinação da robustez foi realizado a partir da variação dos seguintes parâmetros: fabricante do álcool etílico absoluto (Quimex® e Alphatec®), fabricante do H₂SO₄ (Proquímicos® e Vetec®), variação do tempo de centrifugação para desproteínização (4, 5 e 6 min) e precipitação dos polissacarídeos (14, 15 e 16 min), variação da marca da centrífuga (Centrífuga Excelsa 2, Fanen® e Centrífuga 5810 R, Eppendorf®), e estabilidade da solução-teste na presença de luz à temperatura ambiente após 24 h.

4.2.6.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada nos níveis de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi verificada por seis determinações individuais a 100% da concentração teste (0,2 g/mL). Para o parâmetro precisão intermediária, a variação entre dois analistas em dois dias diferentes, foi analisada em triplicata, na concentração de 100%.

4.2.6.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação, através da adição do padrão de glicose em concentração conhecida (10 µg) às amostras a 75, 100 e 125% da concentração teste (0,15; 0,2 e 0,25 g/mL), contemplando a faixa de linearidade do método. Os valores de recuperação, expressos em percentagem, foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente com as concentrações teóricas correspondentes (BRASIL,

2003).

4.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS TOTAIS DAS PARTES AÉREAS DE *T. occidentalis*

Realizou-se a seleção e padronização, através de planejamento fatorial, do processo para obtenção da solução extrativa de *T. occidentalis*, levando-se em consideração a obtenção de maiores rendimentos de polissacarídeos, empregando método analítico validado, para doseamento de polissacarídeos totais (4.2).

4.3.1 Matérias-primas

Foram utilizados o álcool etílico P.A (Quimex®), o TCA (Vetec®), o H₂SO₄ (Proquímicos®). As substâncias antrona e padrão de glicose foram utilizadas da marca Sigma Aldrich®.

4.3.2 Reagentes de antrona

O reagente de antrona foi preparado, utilizando-se uma concentração de 0,2% (p/v) de antrona, em uma mistura de H₂SO₄ e água, com proporção de 6:1.

4.3.3 Obtenção da solução extrativa

A solução extrativa foi obtida através de extração aquosa sob aquecimento, em banho-maria a 80°C, empregando-se uma proporção de 3,0 g de droga vegetal para cada 30 mL de água destilada, durante 2,5 h. A solução extrativa foi resfriada à temperatura ambiente (25°C) e filtrada em algodão.

4.3.4 Experimento de fator-único

O efeito da temperatura, do tempo e da proporção de droga vegetal utilizados na extração foram avaliados através de testes de fator-único, variando cada parâmetro por vez.

4.3.5 Metodologia de superfície resposta – planejamento fatorial 3^2

Com base no experimento de fator-único, a Metodologia de Superfície Resposta empregando um planejamento fatorial foi adotado para selecionar as melhores condições tecnológicas de extração dos polissacarídeos de *T. occidentalis*. Para tanto, realizou-se um planejamento 3^2 (2 variáveis, em 3 níveis de variação) aumentado de 2 pontos centrais para avaliação do efeito da temperatura e do tempo de extração (variáveis independentes), bem como das suas interações sobre o rendimento extrativo dos polissacarídeos (variável dependente).

A Tabela 3 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado, selecionados com base nos testes de fator único. O tratamento estatístico foi feito pelo software STATISTICA®, e foram fornecidos os gráficos de Pareto e de Superfície de Resposta para a avaliação dos resultados.

Tabela 3- Níveis das variáveis do planejamento fatorial 3^2 .

Nível	Temperatura (°C)	Tempo (h)
- 1 (Inferior)	85	4
0 (Central)	90	4,5
+1 (Superior)	95	5,0

4.3.6 Determinação de teor de polissacarídeos totais

O teor de polissacarídeos totais foi determinado pelo método de antrona (4.2.5), usando a glicose como padrão e a solução-teste como amostra. Para

obtenção da solução-teste, procedeu-se removendo os interferentes proteicos através de centrifugação a 4000 rpm, por 5 min, de uma alíquota de 2 mL da solução extrativa tratada com 0,24 mL de TCA 10% (v/v); seguida da precipitação etanólica dos polissacarídeos através do tratamento do sobrenadante com etanol absoluto na proporção de 1:3 (sobrenadante: etanol) e centrifugação a 4000 rpm por 5 min, com posterior dissolução dos polissacarídeos em água (10,0 mL).

O teor foi calculado com base na curva-padrão e expresso em mg/g do peso seco de *T. occidentalis*. Para obtenção da curva, adicionaram-se 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mL de uma solução padrão de glicose (100 µg/mL) em tubos de ensaio, completando-os com 1,0 mL de água destilada. Em seguida, adicionaram-se 5,0 mL do reagente de antrona. Os tubos de ensaio foram colocados em um banho de água fervente Nova Ética® durante 10 min de aquecimento, e arrefecidos rapidamente à temperatura ambiente. Para obtenção do branco e das amostras da solução extrativa, utilizaram-se, respectivamente, 1,0 mL de água destilada, e 0,4 mL de solução-teste, completando-se o volume para 1,0 mL com água destilada.

Após o arrefecimento do branco, padrão e amostras, o teor de polissacarídeos foi determinado em espectrofotômetro (UV/Vis-mini-1240, Shimadzu®) no comprimento de onda de absorção máxima (625 nm).

4.3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos a partir da média de três determinações. Para constatação da significância estatística foram aplicados os testes de variância *t-Student* ou ANOVA, quando aplicável, considerando um nível de significância de 95%.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA DE *T. occidentalis*

4.4.1 Obtenção da solução extrativa de *T. occidentalis*

A solução extrativa de *T. occidentalis* foi obtida através de extração aquosa sob aquecimento em banho-maria a 95°C, empregando-se 4,0 g do material vegetal e 30 mL de água destilada, durante 4 h. Estes parâmetros foram selecionados, com base nos maiores rendimentos de polissacarídeos totais, verificados no planejamento fatorial realizado.

4.4.2 Caracterização da solução extrativa de *T. occidentalis*

A solução extrativa de *T. occidentalis* foi caracterizada conforme ensaios previstos na Farmacopeia Brasileira (2010). Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

4.4.2.1 Determinação do pH

O pH foi medido a 25 °C em potenciômetro Micronal® calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0, utilizando-se cerca de 20 mL de solução extrativa.

4.4.2.2 Determinação da densidade relativa

A solução extrativa foi colocada em picnômetro de 25,0 mL previamente pesado e calibrado com água. O peso da água e da solução extrativa foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. O resultado foi determinado pela razão entre a massa da solução extrativa e a massa da água.

4.4.2.3 Determinação de resíduo seco

Uma alíquota de 2,0 mL da solução extrativa foi transferida para pesa-filtro previamente dessecado e pesado, sendo evaporada até a secura em banho-maria, sob agitação ocasional. Após evaporação, a placa de Petri contendo a amostra foi dessecada em estufa a 105°C durante 3 h e transferidos para dessecador para resfriamento. O resíduo seco foi calculado em percentagem sobre o volume.

4.4.2.4 Determinação de polissacarídeos totais

O teor de polissacarídeos totais foi determinado conforme método previamente validado (4.3.6).

4.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE *T. occidentalis*

O extrato seco de *T. occidentalis* foi obtido através de liofilização e, em seguida, caracterizado através de diferentes métodos, conforme descrito a seguir:

4.5.1 Obtenção do extrato seco de *T. occidentalis*

O extrato seco de *T. occidentalis* foi obtido por liofilização a partir da solução extrativa (4.4.1). A solução foi primeiramente congelada em ultrafreezer a $-90^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 h, e em seguida, liofilizada (Liotop®) sob pressão de 24 μmm de Hg; vácuo 220 ± 2 Vca. por 96 h. O produto foi acondicionado em frascos-ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo. O rendimento de secagem foi avaliado através da razão entre massa do extrato seco obtido e o volume da solução extrativa utilizada.

4.5.2 Caracterização do extrato seco de *T. occidentalis*

4.5.2.1 Descrição macroscópica

O extrato seco de *T. occidentalis* foi visualizado a olho nu, sobre uma placa de Petri para verificação do aspecto e cor.

4.5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no CETENE com o intuito de verificar a forma e estrutura das partículas do extrato seco de *T. occidentalis* após prévia metalização da amostra com filme de ouro. A análise foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura FEI® - modelo QUANTA 200 F; e os aumentos escolhidos para a visualização foram de 100, 600 e 1600 vezes.

4.5.2.3 Determinação de pH

Cerca de 0,5 g do extrato seco de *T. occidentalis* foram pesados e dispersos em 15 mL de água destilada. O pH foi medido a 25 °C, com potenciômetro calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0 (SPANIOL, 2007).

4.5.2.4 Determinação do tamanho de partícula por granulometria a laser

A granulometria a laser foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) em analisador de distribuição de tamanho de partícula Microtac® S3500, com módulo de medida SDC, taxa de fluxo 70% e modelo de difração Fraunhofer. O experimento foi realizado por via úmida, utilizando uma dispersão do extrato seco de *T. occidentalis* em acetona, na proporção de 0,38 mg

para 100 mL. A suspensão foi submetida à agitação em banho ultrassônico Unique® mod. USC-1400^a, com potência ultrassônica 135 Watts, durante 1 minuto, antes de ser analisada.

4.5.2.5 Espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IV)

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do extrato seco de *T. occidentalis* foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Modelo Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, *Pike Technologies Spectroscopic Creativity*) com cristal de selenato de zinco. O extrato foi transferido diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, na forma sólida. Os espectros foram obtidos com varredura de 4000 a 650 cm⁻¹ em resolução de 4 cm⁻¹.

4.5.2.6 Caracterização térmica

As curvas de termogravimetria (TG) foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo DTG 60H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa do extrato seco de *T. occidentalis*, em torno de 4 mg ($\pm 0,5$), acondicionadas em cadinho de alumina, nas razões de aquecimento 10 °C.min⁻¹, até 600°C. Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do software TA-60WS® (*Thermal Analysis*) versão 2.20 da Shimadzu®.

4.5.2.7 Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco

O extrato seco de *T. occidentalis* foi pesado (120 mg) e tratado previamente a 100°C por 5 h, em estufa, para otimização do processo de adsorção. Posteriormente, a amostra foi desgaseificada por 12 h a 110°C para remover qualquer material adsorvido no interior dos poros e na superfície do material. As

análises foram realizadas obtendo-se as isotermas de adsorção e dessorção, aplicando-se os modelos apropriados para o ajuste dos pontos experimentais. A isoterma de adsorção/dessorção foi obtida pela adsorção física progressiva de nitrogênio a 77 K sobre o material, e subsequente dessorção (SANTOS, 2013). A medida da área superficial específica foi obtida por adsorção física de nitrogênio sobre o material, pelo método *Brunauer-Emmett-Teller* (BET) e a determinação da porosidade (tamanho de poro e volume total de poros) pelo método de *Barret-Joyner-Halenda* (BJH). Para a realização destes ensaios, foi utilizado um analisador de área superficial e tamanho de poros ASAP2440 micromeritics®, munido de software para determinar a área superficial e porosidade.

4.5.2.8 Determinação da higroscopicidade

A determinação da higroscopicidade do líofilo de *T. occidentalis* foi realizada conforme técnica adaptada e descrita por Ferreira (2009). Amostras de 0,5 g, em quadruplicata, foram acondicionadas em pesa-filtros e submetidas à exposição de diferentes condições de umidade relativa (UR): 25, 70 e 100% ($\pm 5\%$) em dessecador, após criação da atmosfera desejada em seu interior, utilizando sílica e soluções saturadas de iodeto de potássio e ureia, respectivamente. Tais condições foram confirmadas através de um termohigrômetro digital J.Prolab® modelo SH 122. As amostras, colocadas no dessecador, foram pesadas sequencialmente durante 13 dias, nas três primeiras 24 h e depois a cada 48 h para verificação do ganho de umidade; sendo a percentagem de água absorvida (% U) calculada em relação ao peso, em gramas, da amostra seca (Ps) e úmida (Pu), através da equação 5:

$$U = [(Pu-Ps)/Ps*100] \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde: U = Percentagem de água absorvida (g); Ps = peso da amostra seca (g); Pu = peso da amostra úmida (g).

4.5.2.9 Determinação de polissacarídeos totais

O teor de polissacarídeos totais foi determinado pelo método de antrona (4.2.5), usando a glicose como padrão e com a modificação dos seguintes parâmetros: ao invés da solução extrativa foi utilizada uma solução-mãe do extrato seco na concentração de 0,02 g/mL.

4.5.2.10 Avaliação das propriedades de compactação

As propriedades de compactação do extrato seco de *T. occidentalis* foram obtidas através da determinação de densidade aparente (d_{AP}), densidade de compactação (d_{CP}), Fator de Hausner (FH) e Índice de Carr (índice de compressibilidade – IC, tabela 4). O ensaio foi realizado com 10 g do extrato em um compactador automático (*Tap Density*, Varian®) provido de uma proveta normatizada. O equipamento promove uma compactação do pó através de movimentos verticais repetidos na proveta. O volume inicial ocupado pelo extrato foi medido, com posterior medição após 10 compactações, necessárias para acomodação do pó (V_{10}) e 1250 compactações (V_{1250}). Ao final das compactações, foi possível avaliar a capacidade de compactação pela subtração de $V_{10} - V_{1250}$. A relação entre a massa do extrato e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou a d_{AP} e d_{CP} , respectivamente (ALVES et al., 2008). Já a compressibilidade do pó foi avaliada através do FH e IC, de acordo com as equações 4 e 5, respectivamente (ALVES et al., 2008; PETROVICK; PETROVICK; BASSANI, 2010).

$$FH = \frac{d_{CP}}{d_{AP}} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$IC = \frac{(d_{CP} - d_{AP})}{d_{CP}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde: FH = Fator de Hausner; IC – Índice de Carr; d_{CP} = densidade de compactação (g/mL); d_{AP} = densidade aparente (g/mL).

Tabela 4- Interpretação do Índice de Carr (IC) para a fluidez de pós (WELLS, apud ANDRADE, 2009).

IC (%)	Fluidez
05 a 15	Excelente
12 a 16	Boa
18 a 21	Moderada
23 a 35	Pobre
33 a 38	Muito pobre
> 40	Muito muito pobre

Legenda: IC = Índice de Carr.

4.5.2.11 Avaliação do ângulo de repouso e tempo de escoamento

O ângulo de repouso foi determinado através do escoamento livre de cerca de 10 g do extrato seco de *T. occidentalis* através de um funil de dimensões padronizadas, cuja abertura de saída encontrava-se a 10 cm de altura sobre uma superfície plana, contendo uma folha de papel milimetrado; onde foi formado um cone de pó. O ângulo formado entre o cone e a superfície é chamado de ângulo de repouso, sendo obtido pelo cálculo de sua tangente através da relação entre a altura (h) e o raio (r) do cone formado. Paralelamente ao ângulo de repouso, foi determinado o tempo necessário para o escoamento livre do extrato através do funil (tempo de escoamento), utilizando-se um cronômetro digital, onde resultados acima de 10 s são considerados com tempo de escoamento infinito (ALVES et al., 2008).

4.6 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *T. occidentalis*

A fração polissacarídica foi isolada a partir da solução extrativa de *T. occidentalis* (4.4.1). Após resfriamento à temperatura ambiente (25°C), a solução extrativa foi filtrada em algodão, e tratada com 0,24 mL de TCA 10% (v/v) para remoção dos interferentes proteicos por centrifugação a 4000 rpm, por 15 min;

seguida de tratamento do sobrenadante com etanol absoluto na proporção 1:3 (sobrenadante: etanol absoluto), com subsequente centrifugação para precipitação dos polissacarídeos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado diluído em água destilada (10,0 mL). A solução diluída de polissacarídeos foi então congelada em ultrafreezer a $-90^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 h, e em seguida, liofilizada (Liotop®) sob pressão de 24 μmm de Hg; vácuo 220 ± 2 Vca. por 96 h. O produto foi acondicionado em frascos-ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo.

4.7 ANÁLISE QUALITATIVA DA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *T. occidentalis*

4.7.1 Preparação de amostras

A fração polissacarídica foi hidrolisada com 0,5 mL de ácido trifluoracético (TFA) 2 M em vial com tampa de rosca teflonada. As amostras foram secas sob uma corrente de N_2 a 50°C para eliminar o ácido, em seguida dissolvidas em água (0,5 mL) e tratadas com 2 mg de NaBH_4 durante 4 h para redução dos monossacarídeos. Uma resina catiônica de ácido forte foi adicionada para interromper a reação e remover o Na^+ . As amostras foram então secas sob uma corrente de N_2 , e em seguida, dissolvidas em MeOH e novamente evaporadas sob uma corrente de N_2 (repetido três vezes) para eliminar o borato residual.

Os alditois foram acetilados durante 12 horas em 0,3 mL de anidrido acético e piridina (1:1, v/v) à temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$), resultando nos acetatos de aditol, que foram extraídos em clorofórmio (CHCl_3) e lavados em 5% de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). O CHCl_3 foi evaporado a temperatura ambiente, e então as amostras levadas para análise em Cromatógrafo Gasoso acoplado com Espectrômetro de Massas (CG-MS).

4.7.2 Análise em CG-MS

Os acetatos de alditol foram analisados em CG-MS Varian® modelo Saturn 2000, equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-225 MS (30 m, 0,25 mm d.i., e 0,25 m de espessura do filme) e detector tipo Ion Trap, com ionização por elétrons (EI) a 70 eV. O hélio (He) 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL/min. A temperatura do forno foi programada de 50 a 220° a 40°C/min; e as temperaturas do injetor e detector foram, ambos de 220°C. Os acetatos de alditol foram identificados com base em seus espectros de massas obtidos pela ionização de elétrons e padrões autênticos (Sigma-Aldrich).

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULANTE DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *T. occidentalis*

4.8.1 Amostras

Foram utilizados esplenócitos de camundongos e Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs) de cidadãos saudáveis, para avaliação de viabilidade celular e determinação dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura *in vitro*.

4.8.1.1 Estudo experimental com camundongos BALB/c

Foram utilizados 7 camundongos BALB/c, do sexo feminino, com uma média de 38-40 dias de vida, e provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE. O procedimento com os animais só foi iniciado após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Experimental com Animais do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFPE, processo nº 23076.025207/2014-12.

4.8.1.2 Estudo experimental com PBMCs

As PBMCs foram obtidas de 4 voluntários clinicamente saudáveis escolhidos de forma aleatória na UFPE. Todos declararam não serem fumantes ou ter consumido qualquer tipo de medicação nos 15 dias que antecederam a coleta das amostras. Para coleta da amostra foi necessária a punção de 12 mL de sangue venoso em tubos de heparina, com uso de materiais descartáveis e antisepsia adequada, por profissional habilitado. O procedimento com os indivíduos só foi iniciado após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde (CCS), sob o processo nº 21991713.3.0000.5208.

4.8.2 Processamento das amostras

4.8.2.1 Preparação dos esplenócitos

Após o sacrifício dos animais com gás carbônico (CO₂), o baço de cada camundongo foi extraído e transferido em uma Placa de Petri contendo Meio RPMI-1640 (Gibco) para ser triturado e as células desagregadas. As suspensões celulares obtidas de cada baço foram filtradas em um Cell Strainer 40µm nylon (BD Bioscience) e transferidas em seguida para tubos de centrifuga tipo Falcon 50 ml para recuperação dos esplenócitos. Os concentrados de baço foram então centrifugados a 300 G, 10 minutos, aceleração 6, freio 4. Quando necessário, o precipitado de células foi tratado com a solução 1X RBC lysis Buffer (eBioscience) para lisar as células vermelhas presentes. Os esplenócitos foram contados em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão por coloração trypan blue, em que as células mortas aparecem em azul. Foram utilizadas apenas as células esplênicas cuja viabilidade foi superior a 98%.

4.8.2.2 Preparação dos PBMCs

As PBMCs foram isoladas a partir do sangue dos pacientes por centrifugação com Ficoll Paque (GE Healthcare Bio-Science). Em seguida, as PBMCs foram recuperadas para tubos de centrifugação com RPMI 1640 (Gibco) e centrifugadas 300-350 G, 20 minutos, aceleração 6, freio 4 para lavagem das mesmas, sendo este processo realizado 2 vezes. Posteriormente, as células foram contadas em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão por coloração trypan blue, em que as células mortas aparecem em azul. Foram utilizadas apenas as PBMCs cuja viabilidade foi superior a 98%.

4.8.3 Avaliação de citotoxicidade

4.8.3.1 Avaliação de citotoxicidade

Para o estudo citotóxico realizado através do MTT, foram testados em triplicata os extratos secos de *T. occidentalis* nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 500 µg/mL para esplenócitos de BALBs, já para a avaliação em PBMCs, as concentrações se repetiram, exceto a concentração de 500 µg/mL. Assim como, para as frações de polissacarídeos, foram avaliados os efeitos citotóxicos utilizando as seguintes concentrações de 5, 25, 50, 100 e 250 µg/mL. Em placas de 96 poços foram colocadas 2×10^6 células de esplenócitos e 5×10^5 de PBMCs. Após 48 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, foi adicionada a solução de MTT (0,5 mg/mL), e incubado por 3 horas. Em seguida, foi adicionada a solução de Dodecil sulfato de sódio (SDS) à 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570 nm, após 24 horas.

4.8.4 Cultura celular

Esplenócitos e PBMCs foram cultivados em placas de 24 poços de fundo chato (1×10^6 células por poço) em Meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), 10mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES) (Gibco) e 200 U/mL de penicilina e estreptomicina (Gibco). As células de esplenócitos foram estimuladas com o controle positivo, a lectina Concanavalina A (ConA) a 5µg/mL, e com os extratos e as frações nas concentrações escolhidas após o teste de citotoxicidade. As PBMCs foram estimuladas com o controle positivo *Phorbol 12 myristate 13 acetate* (PMA) 100 ng/mL (Sigma) + Ionomicina 1µg/mL (Sigma), e com os extratos e as frações nas concentrações escolhidas após o teste de citotoxicidade. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em 5% CO₂ e após 48 horas o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação da atividade imunomoduladora.

4.8.5 Doseamento de citocinas

A avaliação da atividade imunomoduladora foi realizada através da quantificação das citocinas presentes nos sobrenadantes das culturas celulares (esplenócitos e PBMCs), após estímulo, durante 24 e 48 h, com seus respectivos controles positivos e com o extrato seco (10, 50, 100 e 200 µg/mL) e fração de polissacarídeos de *T. occidentalis* (5, 25, 50, 100 e 250 µg/ mL).

O método utilizado para quantificação das citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos e PBMCs foi o *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) tipo sanduíche, seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. O espectrofotômetro utilizado foi o BioTek EL808, e a diferença das absorbâncias nos comprimentos de 450-570nm foi utilizada para cálculo da concentração.

As citocinas avaliadas no sobrenadante de cultura de esplenócitos foram: IL-6 (BD Biosciences®), IL-17A (eBiosciences®), IL-22 (eBiosciences®) e IL-10 (BD Biosciences®). Seus limites inferiores de detecção foram de 7,8 pg/mL; 3,9 pg/mL;

3,9 pg/mL e 15.6 pg/mL, respectivamente. Já as citocinas avaliadas no sobrenadante de cultura de PBMCs foram: IL-1 β (BD Biosciences®), IL-6 (BD Biosciences®), IL-2 (eBiosciences®) e Interferon-gama (INF- γ) (BD Biosciences®). Seus limites inferiores de detecção foram de 1,9 pg/mL; 4,69 pg/mL; 1,5 pg/mL e 4.69 pg/mL, respectivamente.

4.8.6 Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos pela média de três determinações. A análise estatística foi realizada através do teste *t-student* (duas vias) *Mann-Whitney*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os testes estatísticos e gráficos foram realizados através do programa GraphPad Prism® versão 5.0.

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *T. occidentalis*

O estresse oxidativo é um processo complexo que envolve diferentes espécies reativas e vários mecanismos, nos quais muitas etapas estão envolvidas, por isso, a avaliação de substâncias antioxidantes deve ser realizada por meio de diferentes métodos (SANTANA et al., 2013). Neste sentido, cinco métodos (DPPH*, ABTS*⁺, TBARS, OH* e NO) foram aplicados para avaliar a capacidade antioxidante do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis*. Para efeito de comparação utilizou-se, como padrão de referência antioxidante em todos os ensaios, o 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico (Trolox®), um análogo sintético da vitamina E com propriedade antioxidante bastante conhecida (controle positivo). O Trolox® tem vantagem sobre os outros antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como a vitamina E devido ao seu moderado efeito hidrossolúvel, além de ser um excelente protetor contra a lipoperoxidação

(FERREIRA, 2008). E o controle negativo foi realizado apenas com o veículo Tween 80 a 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, usado para emulsificar o extrato seco e a fração polissacarídica de *T. occidentalis* durante os experimentos *in vitro*. Adicionalmente, todos os ensaios foram realizados nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

4.9.1 Sequestro do radical DPPH•

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH•, foi utilizada a metodologia descrita por Silva e colaboradores (2005), com modificações. Uma mistura reacional contendo 2,7 mL da solução etanólica de DPPH• (40 µg/mL) e o extrato seco ou fração polissacarídica de *T. occidentalis* nas concentrações (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL) foi agitada vigorosamente e incubada à temperatura ambiente na ausência de luz durante 30 minutos. A absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, em $\lambda = 517$ nm, e expressos como percentagem de sequestro do radical DPPH• pela equação 6:

$$\% \text{ de sequestro do radical DPPH}^\bullet = \{(A_{\text{sistema}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{sistema}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde: A_{sistema} = absorvância inicial da solução etanólica de DPPH•; $A_{\text{mistura reacional}}$ = absorvância da mistura reacional contendo o radical DPPH• e as concentrações do extrato seco ou fração polissacarídica de *T. occidentalis*.

Para tanto, a concentração efetiva (CE_{50}) do extrato seco e da fração polissacarídica de *T. occidentalis* necessária para inibir o radical DPPH• foi determinada em 50%. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o padrão Trolox® nas mesmas concentrações das amostras em estudo.

4.9.2 Sequestro do radical (ABTS^{•+})

O sequestro do radical ABTS^{•+} é um método antioxidante convencional, simples e extensivamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de um determinado composto (FLOEGEL et al., 2011). Neste método, o radical ABTS^{•+} de coloração azul/verde é produzido por meio da oxidação da solução de ABTS pelo persulfato de potássio (NIKI, 2010). De modo geral, a capacidade antioxidante é determinada pela eliminação do radical catiônico gerado (DU et al., 2014), sendo monitorada pelo desaparecimento da coloração e redução da absorvância a 734 nm (NIKI, 2010).

Com o propósito de, avaliar a atividade antioxidante do extrato e fração polissacarídica de *T. occidentalis*, o método do ABTS^{•+} foi utilizado de acordo com a metodologia descrita por Re e colaboradores (1999), contudo, com modificações. Inicialmente, o cátion radical ABTS^{•+} foi formado a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS com 88 µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈). A mistura foi incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol até ser obtida uma solução com absorvância de 1,00± 0,05, em λ = 734 nm. Em ambiente escuro e à temperatura ambiente foram transferidas várias concentrações do extrato seco ou da fração polissacarídica de *T. occidentalis* (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL) para tubos de ensaio contendo 1960 µL do radical ABTS^{•+}. Após 6 minutos de reação, a absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, em λ = 734 nm, e os resultados foram expressos como percentagem de sequestro do radical ABTS^{•+} pela equação 7:

$$\% \text{ sequestro do radical ABTS}^{\bullet+} = \{(A_{\text{sistema}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{sistema}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde: A_{sistema} = absorvância inicial da solução etanólica de ABTS^{•+}; A_{mistura reacional} = absorvância da mistura reacional contendo o radical ABTS^{•+} e as concentrações do extrato seco ou fração

polissacarídica de *T. occidentalis*.

Foi determinada a concentração efetiva (CE_{50}) do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* necessária para reduzir a absorvância do radical ABTS•+ em 50%. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o padrão Trolox® nas mesmas concentrações das amostras em estudo.

4.9.3 Inibição da peroxidação lipídica – Método de determinação de TBARS

Para avaliação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica, foi realizado o método TBARS, conforme Guimarães e colaboradores (2010); sendo o homogenato da gema de ovo (1%, m/v) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) usado como substrato rico em lipídios. Deste homogenato, 0,5 mL foi sonificado e homogeneizado com diferentes concentrações do extrato seco e da fração polissacarídica de *T. occidentalis* (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 mg/mL). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de dihidrocloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropinamida (AAPH) 0,12 M. A reação foi realizada durante 30 minutos a 37 °C. Após resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de TCA (15%) a 1200 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 0,5 mL de TBA (0,67%) e aquecido a 97°C durante 15 minutos. Após o resfriamento, as absorvâncias dos tubos contendo diferentes concentrações das amostras foram medidas a 532 nm utilizando um espectrofotômetro.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da peroxidação lipídica, com base na diminuição dos níveis de TBARS formadas pelo AAPH, conforme pela equação 8:

$$\% \text{ de inibição da peroxidação lipídica} = \{(A_{\text{sistema}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{sistema}}$$

(Eq.8)

Onde: A_{sistema} = absorvância da peroxidação lipídica induzido pelo AAPH sem as amostras em estudo; $A_{\text{mistura reacional}}$ = absorvância da peroxidação lipídica induzido pelo AAPH com as concentrações do extrato seco ou fração polissacarídica de *T. occidentalis*.

Foi determinada a concentração efetiva (CE_{50}) do extrato seco e da fração polissacarídica de *T. occidentalis* necessária para inibir a peroxidação lipídica em 50%. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o padrão Trolox® nas mesmas concentrações das amostras em estudo.

4.9.4 Sequestro do radical OH•

Para a avaliação da capacidade antioxidante contra o radical OH• gerado pela reação de Fenton, foi utilizada a metodologia descrita por Lopes e colaboradores (1999), com modificações. Várias concentrações do extrato seco ou fração polissacarídica de *T. occidentalis* (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL) foram adicionadas à mistura da reação de Fenton contendo 6 mM de sulfato ferroso ($FeSO_4$), 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). A reação foi realizada à temperatura ambiente, durante 15 minutos, e estacionada pela adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 4% (v/v) seguido por TBA a 1% (m/v), em hidróxido de sódio (NaOH) 50 mM. Logo após, a mistura reacional foi aquecida durante 1 hora a 37 °C e então arrefecida à temperatura ambiente. A absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, a 532 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de sequestro do radical OH•, com base na inibição da degradação da 2-desoxirribose, pela equação 9:

$$\% \text{ sequestro do radical OH}^\bullet = \{(A_{\text{sistema}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{sistema}} \quad (\text{Eq.9})$$

Onde: A_{sistema} = absorvância inicial do sistema gerador de radicais hidroxila (reação de Fenton) sem as amostras em estudo; $A_{\text{mistura reacional}}$ = absorvância da mistura reacional contendo a mistura da reação de Fenton e as concentrações do extrato seco ou fração polissacarídica de *T. occidentalis*.

Foi determinada a concentração efetiva (CE_{50}) do extrato seco e da fração polissacarídica de *T. occidentalis* necessária para inibir a degradação da 2-desoxirribose em 50%. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o padrão Trolox® nas mesmas concentrações das amostras em estudo.

4.9.5 Sequestro do NO

Nesta avaliação, o NO foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) 20 mM em tampão fosfato (pH 7,4). Uma vez gerado, o NO interage com oxigênio para produzir íons NO_2^- , os quais foram medidos pela reação de Griess conforme método de Basu e Hazra (2006). A mistura reacional (1,0 mL) contendo NPS 10 mM em tampão fosfato e várias concentrações do extrato seco ou fração polissacarídica de *T. occidentalis* (0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL) foi incubada a 37 °C por 1 hora. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico a 5% e N-(1-naftil)etilenodiamina a 0,1% em água).

A absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, a 540 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de NO, com base na inibição da formação de íons NO_2^- , conforme demonstrado na equação 10:

$$\% \text{ de inibição da NO} = \{(A_{\text{sistema}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{sistema}} \quad (\text{Eq.10})$$

Onde: A_{sistema} = absorvância do veículo com o NPS em tampão fosfato; $A_{\text{mistura reacional}}$ = absorvância da mistura reacional contendo NPS em tampão fosfato e as concentrações do extrato seco ou fração polissacarídica de *T. occidentalis*.

Foi determinada a concentração efetiva (CE_{50}) do extrato seco e da fração polissacarídica de *T. occidentalis* necessária para inibir a produção de íons NO_2^- em 50%. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o padrão Trolox® nas mesmas concentrações das amostras em estudo.

4.9.6 Análise estatística

Os resultados da avaliação da propriedade antioxidante do extrato seco e da fração polissacarídica de *T. occidentalis* foram expressos pela média de três determinações. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA *one way*, seguido pelo teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os valores da concentração efetiva 50% (CE_{50}) foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad 5.01®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL (*T. occidentalis*)

5.1.1 Obtenção da droga vegetal (estabilização, secagem e pulverização)

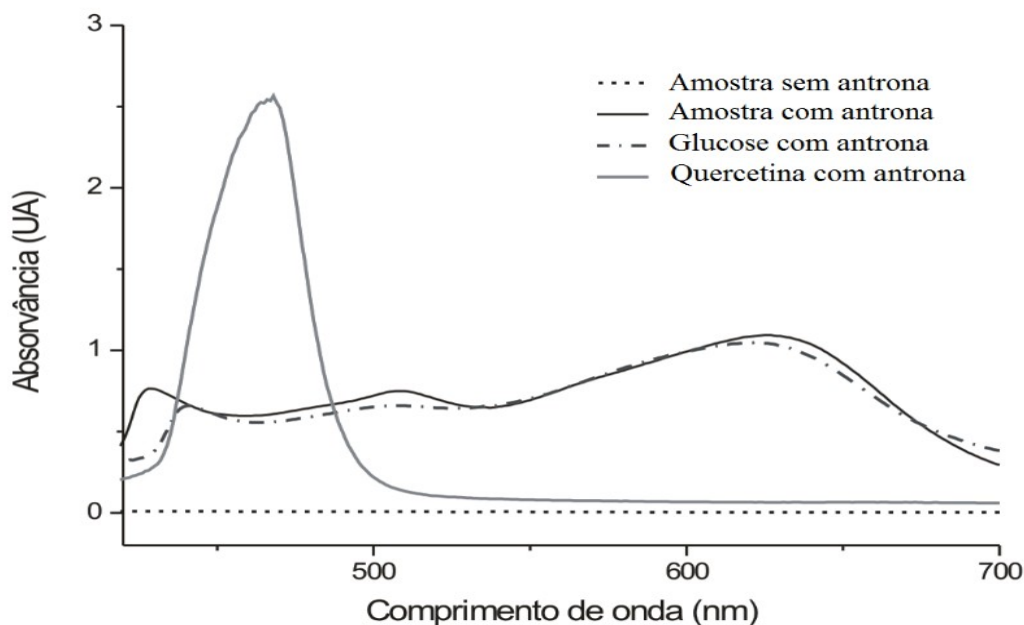
As partes aéreas de *T. occidentalis* apresentaram um rendimento de secagem de 54,4%.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSEAMENTO DE POLISSACARÍDEOS TOTAIS DAS PARTES AÉREAS DE *T. occidentalis*

5.2.1 Validação do método analítico

Na Figura 6 estão apresentados os espectros de varredura obtidos para as amostras da solução-teste com e sem adição do reagente de antrona, em comparação com os espectros dos padrões de glicose e quercetina, após adição do reagente. Os dados apresentados permitiram observar que não há similaridade importante entre os espectros da solução-teste e da glicose, com o da quercetina, confirmando então que o comprimento de onda de 625 nm selecionado para o método representa satisfatoriamente o marcador eleito para a espécie.

Figura 6 - Espectros de varredura obtidos na análise de especificidade do método de antrona para determinação dos polissacarídeos de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

Para avaliar a linearidade da resposta analítica, foi executada regressão linear para as curvas obtidas a partir de cinco concentrações da solução extrativa nas regiões de 0,1 a 0,25 g/mL e cinco alíquotas da solução-teste na faixa de 0,2 a 0,6 mL. Os dados da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados apresentaram valores de coeficientes de determinação (R^2) de 0,9987 e 0,9945 para a solução extrativa e solução-teste, respectivamente, denotando que mais de 99% (99,87 e 99,45%, respectivamente), da variabilidade experimental é explicada satisfatoriamente pelas equações propostas ($y = 1,5067x + 0,1661$, para a solução extrativa, e $y = 8,4345x - 0,0956$, para solução-teste), comprovando a relação linear entre o aumento da concentração do analito e a resposta espectrofotométrica. Os dados permitiram afirmar que o desempenho do método atende aos requisitos preconizados para análise desse parâmetro.

Considerando os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), os resultados encontrados foram 0,052 e 0,175 mg/g, e 0,053 e 0,177 mg/g para

solução extrativa e solução-teste, respectivamente. Com esses resultados, verificou-se que os procedimentos proporcionam resposta espectrofotométrica com sensibilidade para detecção e quantificação dos polissacarídeos totais de *T. occidentalis* com a confiabilidade desejada.

Quanto à robustez, o método apresentou considerável resistência a pequenas e deliberadas modificações às condições efetuadas nos ensaios, uma vez que todos os F calculados foram menores que os F tabelados ao se utilizar ANOVA de uma entrada (ANOVA *One-Way*) e t calculados menores que os t tabelados ao se utilizar Teste *t-Student* como tratamento estatístico. Os resultados das análises estão sumarizados na tabela 5.

Tabela 5- Robustez do método de antrona para determinação dos polissacarídeos de *T. occidentalis*.

Parâmetros	Variáveis	Tempo (min)	Média (mg/g) $\pm$ dp	Análise estatística
Fabricante do álcool etílico	Quimex®	-	3,02 $\pm$ 0,10	t calculado: 0,86
	Alphatec®	-	3,08 $\pm$ 0,07	t tabelado: 2,78
Fabricante do H ₂ SO ₄	Proquímicos®	-	3,02 $\pm$ 0,10	t calculado: 0,37
	Vetec®	-	2,98 $\pm$ 0,09	t tabelado: 2,78
Tempo de centrifugação	Desproteínização	4	2,91 $\pm$ 0,15	F calculado: 0,82
		5	2,98 $\pm$ 0,03	F tabelada: 5,14
		6	3,03 $\pm$ 0,12	
	Precipitação dos polissacarídeos	14	2,95 $\pm$ 0,05	F calculado: 4,48
		15	2,98 $\pm$ 0,03	F tabelada: 5,14
		16	2,90 $\pm$ 0,01	
Marca da centrífuga	5810 R	-	2,79 $\pm$ 0,07	t calculado: 1,83
	Eppendorf®	-	2,87 $\pm$ 0,01	t tabelado: 2,78
	Excelsa 2 Fanen®	-		

Legenda: dp – desvio padrão.

O método propiciou ainda resposta espectrofotométrica precisa nos dois níveis analisados: repetitividade e precisão intermediária (Tabela 6). Quanto ao parâmetro repetitividade, o resultado apresentou resposta média em polissacarídeos totais de 3,14 mg/g e CV% de 4,78%, um valor abaixo do máximo de 5% preconizado pela RE nº899 (BRASIL, 2003) e de 15% para material vegetal

(BRASIL, 2013). Quanto ao parâmetro precisão intermediária, foi demonstrado, através do tratamento estatístico por ANOVA de duas entradas (ANOVA *two-way*), que os procedimentos foram precisos para as análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6- Precisão intermediária do método de antrona para determinação dos polissacarídeos de *T. occidentalis*.

	Dia 1	Dia 2	Analista	Dia
Analista 1	3,16 ± 0,09 (mg/g)	3,21 ± 0,05 (mg/g)	F calculado: 0,71	F calculado: 5,32
Analista 2	3,11 ± 0,09 (mg/g)	3,20 ± 0,02 (mg/g)	F tabelado: 2,84	F tabelado: 5,32

A exatidão do método, calculada pelo teste de recuperação, foi avaliada sob dois aspectos: a capacidade de extração do analito e a repetibilidade das respostas (Tabela 7). De acordo com os dados obtidos, não houve interferência significativa do método sobre a recuperação dos polissacarídeos, pois as respostas apresentaram-se bastante exatas, com taxas de recuperação dentro dos limites desejáveis (próximos a 100%), e confirmadas através do baixo CV%, em todos os níveis testados (BRASIL, 2003) (Tabela 7).

Tabela 7- Teste de recuperação do método de antrona para determinação dos polissacarídeos de *T. occidentalis*.

Solução extrativa (g/mL)	Valor teórico (µg/mL)	Valor real (µg/mL) ± dp (CV%)	Recuperação (%)
0,15	3,00	2,99 ± 0,04 (1,46)	99,81
0,20	3,59	3,51 ± 0,02 (0,49)	97,85
0,25	4,41	4,31 ± 0,03 (0,78)	97,76

Legenda: dp – desvio padrão; CV – Coeficiente de variação.

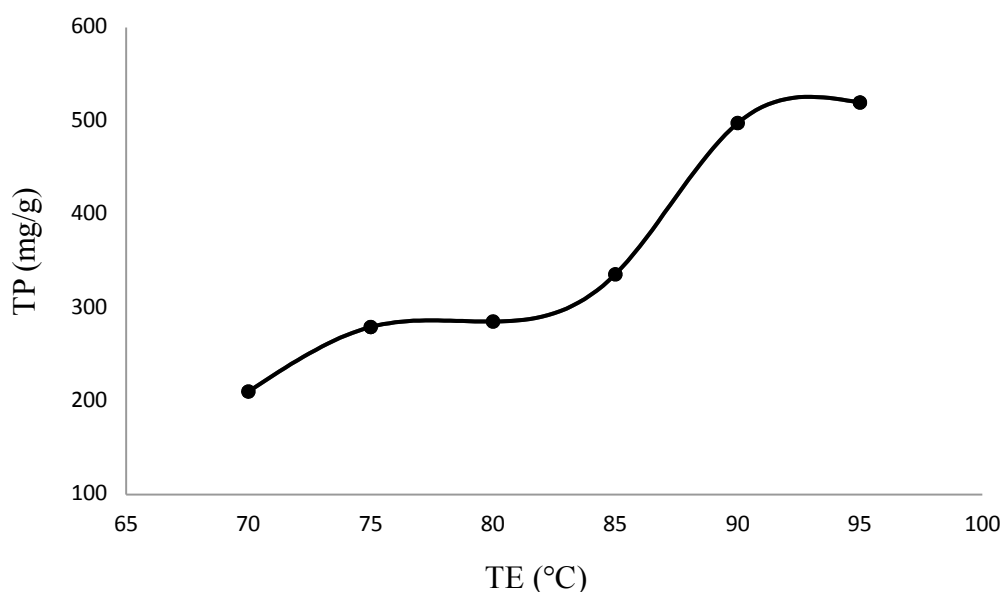
5.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DAS PARTES AÉREAS DE *T. occidentalis*

A otimização da extração de polissacarídeos das partes aéreas de *T. occidentalis* foi realizada em duas etapas, sendo a primeira um experimento de fator único para selecionar os 3 níveis de temperatura e tempo de extração a serem empregados no planejamento fatorial 3^2 (segunda etapa), além da melhor proporção droga vegetal: água para a Thuja. Os resultados e discussão realizada estão descritos a seguir.

5.3.1 Experimento de fator-único

O efeito da temperatura sobre a extração dos polissacarídeos totais de *T. occidentalis* está demonstrado na Figura 7. Para avaliação, foram selecionados os seguintes pontos 70, 75, 80, 85, 90 e 95°C, com base em estudos prévios e dados da literatura (JIANG et al., 2010; TANG et al., 2011; TIAN et al., 2011; YE & JIANG, 2011, JIN et al., 2012; LUO, 2012); enquanto as outras condições foram mantidas constantes (tempo de 2,5 h e proporção de droga vegetal: água de 3 g para 30 mL.

Figura 7 - Efeito de diferentes temperaturas sobre a extração dos polissacarídeos de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

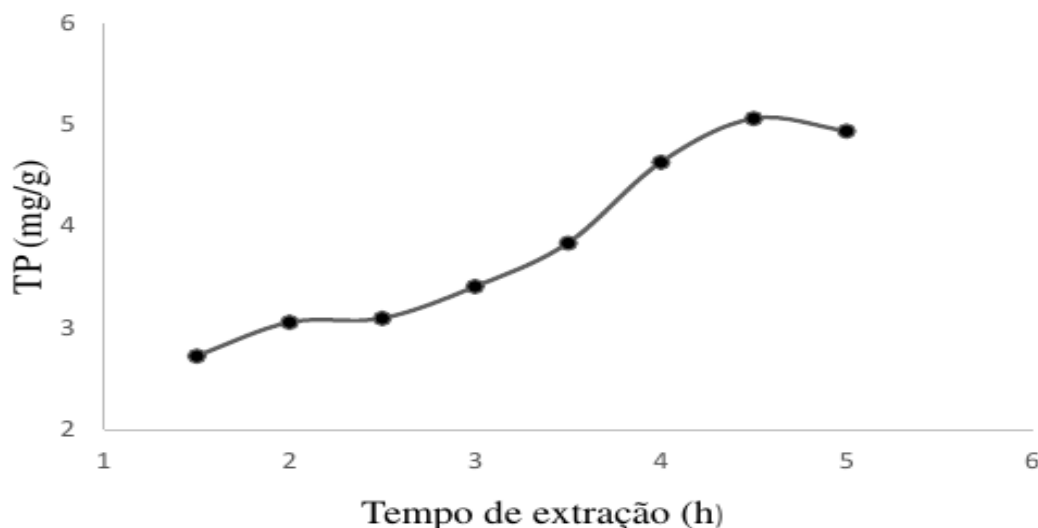
Legenda: TP - Teor de Polissacarídeos; TE - Temperatura de Extração.

Na Figura 7, pode ser observado que, com o aumento da temperatura, o teor polissacarídeos aumentou gradualmente de 70 até 95°C, estando esta tendência em concordância com relatos de outros autores (WU et al., 2007; JIANG et al., 2010; TANG et al., 2011; TIAN et al., 2011; YE & JIANG, 2011, JIN et al., 2012; LUO, 2012), possivelmente em virtude de sua maior solubilidade em temperaturas elevadas (WU et al., 2007; TAN et al., 2011). Contudo, entre 90 e 95°C o aumento não foi estatisticamente significativo, conforme demonstrado pelo teste t *Student*, com $t_{\text{calculado}} (1,73) < t_{\text{tabelado}} (2,78)$, estando em concordância com outros relatos científicos (SUN et al., 2011). Portanto, a temperatura de 90°C foi selecionada como ponto central para o planejamento fatorial.

Além da temperatura, o tempo de extração é um importante fator que afeta a eficiência de extração dos polissacarídeos (SUN et al., 2011), de modo que o efeito de diferentes intervalos (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 h) foram avaliados para *T. occidentalis*, baseando em estudos prévios e dados da literatura (JIANG et al.,

2010; TANG et al., 2011; TIAN et al., 2011; YE & JIANG, 2011, JIN et al., 2012; LUO, 2012); enquanto as demais condições foram mantidas constantes (temperatura de 80°C e proporção de droga vegetal: água de 3 g para 30 mL).

Figura 8 - Efeito de diferentes tempos sobre a extração dos polissacarídeos totais de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

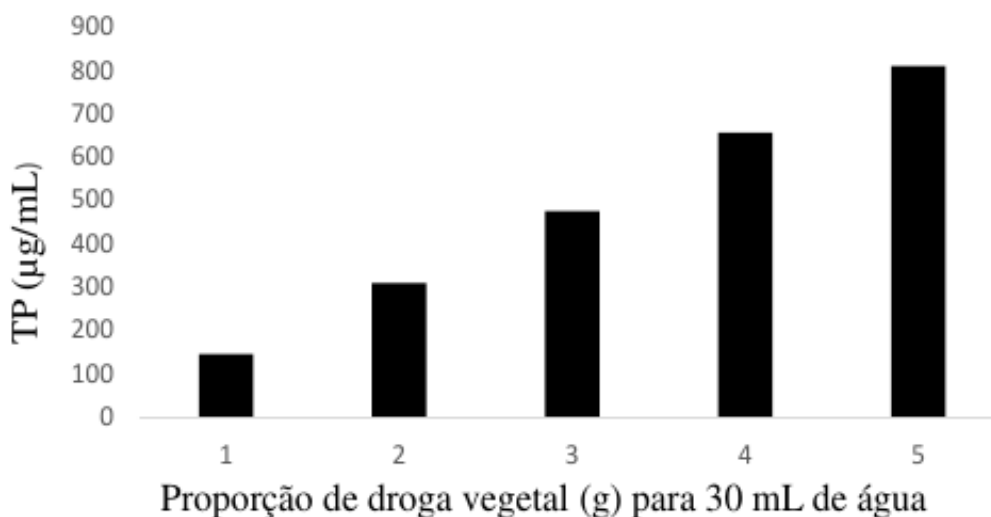
Legenda: TP – Teor de Polissacarídeos.

Conforme demonstrado na Figura 8, o teor de polissacarídeos acompanhou o aumento do tempo de extração até 4,5 h, tendo em vista, que quanto maior a duração da extração, maior a tendência de solubilização dos polissacarídeos em água (WU et al., 2007; TAN et al., 2011; TANG et al., 2011) devido ao tempo requerido para sua liberação a partir do material vegetal (YE & JIANG, 2011). No entanto, após 4,5 h a solubilização dos polissacarídeos atingiu um equilíbrio, havendo ainda um leve decréscimo no intervalo de 4,5 a 5,0 h. Embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa, como demonstrado pelo teste *t Student* [$t_{\text{calculado}} (1,73) < t_{\text{tabelado}} (2,78)$], é possível presumir que, a partir de 5,0 h, esteja havendo um possível início de degradação térmica dos polissacarídeos (TAN et al., 2011; TANG et al., 2011; CHEN et al., 2012b). Portanto, o tempo de extração

escolhido como ponto central para o planejamento fatorial foi de 4,5 h (TAN et al., 2011).

A razão sólido: líquido tem um grande efeito sobre a taxa de extração de polissacarídeos (TANG et al., 2011). Portanto, com base em estudos prévios, o efeito de diferentes proporções de droga vegetal: água (1; 2; 3; 4 e 5 g para 30 mL) sobre a extração dos polissacarídeos de *T. occidentalis*, foi avaliado, empregando-se as condições ótimas de temperatura (90°C) e tempo (4,5 h) de extração. Os resultados encontram-se ilustrados nas Figuras 9 e 10. Enquanto na Figura 9 se observa uma tendência crescente da extração, com o aumento da proporção de droga vegetal empregada, na figura 10 é possível verificar que o melhor rendimento de extração, conforme o peso seco de *T. occidentalis*, foi obtido com a proporção de 4 g de droga vegetal para 30 mL de água, embora não tenha sido demonstrada uma diferença estatisticamente significativa entre 4 a 5 g para 30 mL, através do teste ANOVA [$F_{\text{calculado}} (2,26) < F_{\text{tabelado}} (5,14)$].

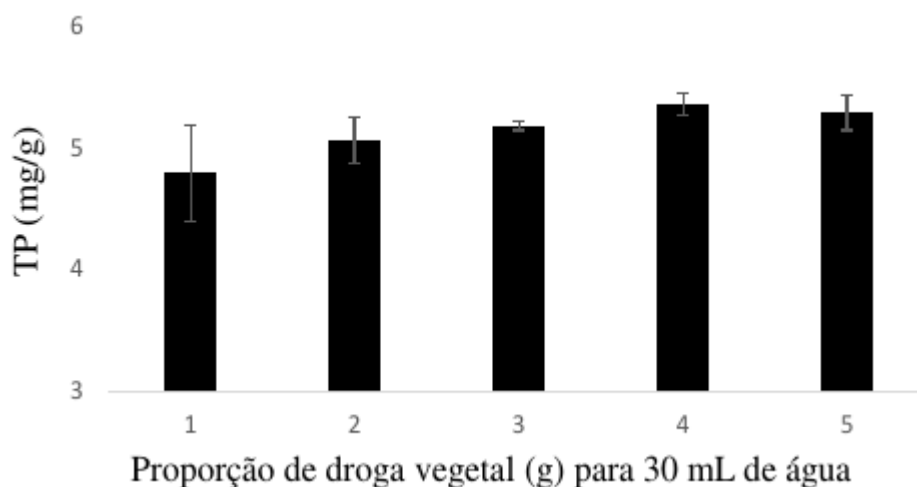
Figura 9 - Efeito de diferentes proporções de droga vegetal sobre o a extração dos polissacarídeos de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

Legenda: TP – Teor de Polissacarídeos.

Figura 10: Efeito de diferentes proporções de droga vegetal sobre a extração dos polissacarídeos, considerando o peso seco de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

Legenda: TP – Teor de Polissacarídeos.

Levando-se isto em considerando e sabendo-se que o efeito da proporção de droga vegetal torna-se fraco quando a dissolução dos polissacarídeos alcança um certo grau (TAN et al., 2011), somado ao fato de que amostras mais concentradas apresentam menor molhabilidade pela água, escolheu-se a proporção de 4 g de droga vegetal para cada 30 mL de água, para obtenção das soluções extrativas empregadas no planejamento fatorial.

5.3.2 Metodologia de superfície de resposta- Planejamento Fatorial 3²

A Metodologia de Superfície Resposta é uma ferramenta estatística que permite a avaliação simultânea de vários parâmetros de interações, empregando-se um número reduzido de ensaios experimentais (YE & JIANG et al, 2011; LUO, 2012; MA et al., 2012; ZHU, LIU, 2013). De modo que tem sido aplicada com sucesso no desenvolvimento e otimização de extração de compostos naturais (YE & JIANG et

al, 2011; ZHU, LIU, 2013), tendo em vista a otimização de processos que envolvem múltiplas variáveis, e que podem interagir entre si, como verificado nos processos extrativos, pode ser insuficiente através da avaliação de uma única variável por vez (MA et al., 2012).

Por este motivo, a Metodologia de Superfície Resposta, empregando o planejamento fatorial 3^2 , aumentado de 2 pontos centrais, foi utilizada para determinação dos níveis ótimos de temperatura e tempo da extração aquosa de *T. occidentalis*; através da avaliação das possíveis interações existentes entre os fatores tempo e temperatura de extração (variáveis independentes), sobre a variável resposta (variável dependente) teor de polissacarídeos.

A matriz de planejamento experimental está apresentada na Tabela 8, acompanhada dos resultados experimentais encontrados. Os níveis de tempo (4,0; 4,5; 5,0 h) e temperatura (85; 90; 95 °C) foram selecionados com base nos resultados dos experimentos de fator-único. Sendo empregada a proporção de droga vegetal: água de 4 g para 30 mL, por ser a proporção mais viável para obtenção da solução extrativa nas condições supracitadas.

Tabela 8- Matriz do planejamento experimental 3^2 para avaliação das variáveis influentes na extração de polissacarídeos de *T. occidentalis*.

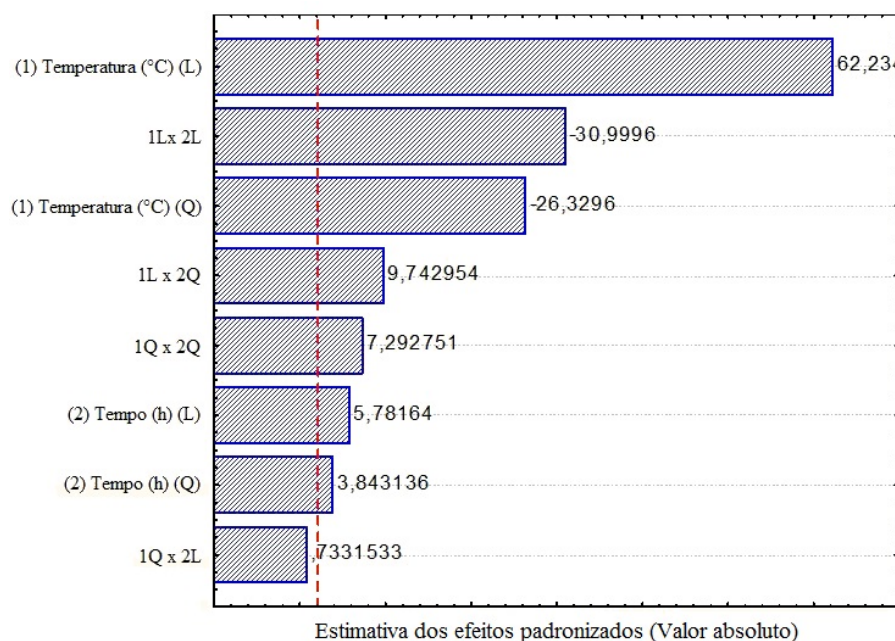
Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis naturais		Variável resposta
	Tempo		Temp (°C)	Tempo (h)	TP (mg/g) $\pm$ dp
	Temp (°C)	(h)			
1	-1,00000	-1,00000	85	4,0	4,88 $\pm$ 0,12
2	-1,00000	0,00000	85	4,5	5,27 $\pm$ 0,10
3	-1,00000	1,00000	85	5,0	6,46 $\pm$ 0,02
4	0,00000	-1,00000	90	4,0	5,65 $\pm$ 0,05
5	0,00000	0,00000	90	4,5	6,21 $\pm$ 0,06
6	0,00000	1,00000	90	5,0	5,90 $\pm$ 0,06
7	1,00000	-1,00000	95	4,0	8,30 $\pm$ 0,08
8	1,00000	0,00000	95	4,5	8,06 $\pm$ 0,10
9	1,00000	1,00000	95	5,0	7,10 $\pm$ 0,03
10	0,00000	0,00000	90	4,5	6,12 $\pm$ 0,06
11	0,00000	0,00000	90	4,5	6,17 $\pm$ 0,09

Legenda: Temp – Temperatura; TP – Teor de polissacarídeos; dp – Desvio padrão.

Os resultados experimentais, dispostos na Tabela 8, apontam que a temperatura de 95°C e tempo de 4,0 h foram as melhores condições para extração aquosa dos polissacarídeos de *T. occidentalis*. Contudo para uma observação mais apropriada sobre os efeitos exercidos pelos fatores temperatura e tempo e suas interações sobre o teor de polissacarídeos; os dados foram analisados através do diagrama de Pareto (Figura 11) e do gráfico de Superfície de Resposta (Figura 12).

O diagrama de Pareto apresentado na Figura 11 indica que, nas condições estudadas, o aumento da temperatura e do tempo exerceram efeito positivo sobre o teor de polissacarídeos, sendo a temperatura o fator mais significativo do ponto de vista estatístico e, portanto, o que mais favoreceu o processo extrativo. Isto foi constatado a partir da linha tracejada vertical do diagrama, que indica o valor mínimo para que se observe esta significância estatística, sendo o efeito mais expressivo quanto mais à direita dessa linha ele estiver (MARQUES, 2011).

Figura 11 - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados obtido pelo planejamento fatorial 32, tendo como fatores a temperatura e o tempo de extração e, como variável resposta o teor de polissacarídeos de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

Legenda: L – Interação linear; Q – Interação quadrática. *O ponto, no qual os efeitos estimados foram

estatisticamente significativos ($p=0,05$) é indicado por uma linha tracejada vertical.

Por outro lado, a interação da temperatura e do tempo exerceu efeito negativo sobre a extração, de modo que o aumento simultâneo desses fatores favoreceu a redução do teor de polissacarídeos. Isto porque o elevado tempo de extração em temperaturas elevadas, pode afetar a estrutura molecular dos polissacarídeos, bem como degradar-lhes, conforme já relatado por outros autores (TAN et al., 2011; TANG et al., 2011; CHEN et al., 2012b).

Por fim, foi possível verificar que dentre todas as interações, apenas a interação Temperatura² x Tempo (1Q x 2L) não foi significativa; de modo que os dados foram reavaliados retirando o termo não significativo. Como resultado, a equação polinomial de segundo grau (equação 11), que demonstrou a relação entre o teor de polissacarídeos e as variáveis avaliadas foi obtido da seguinte forma:

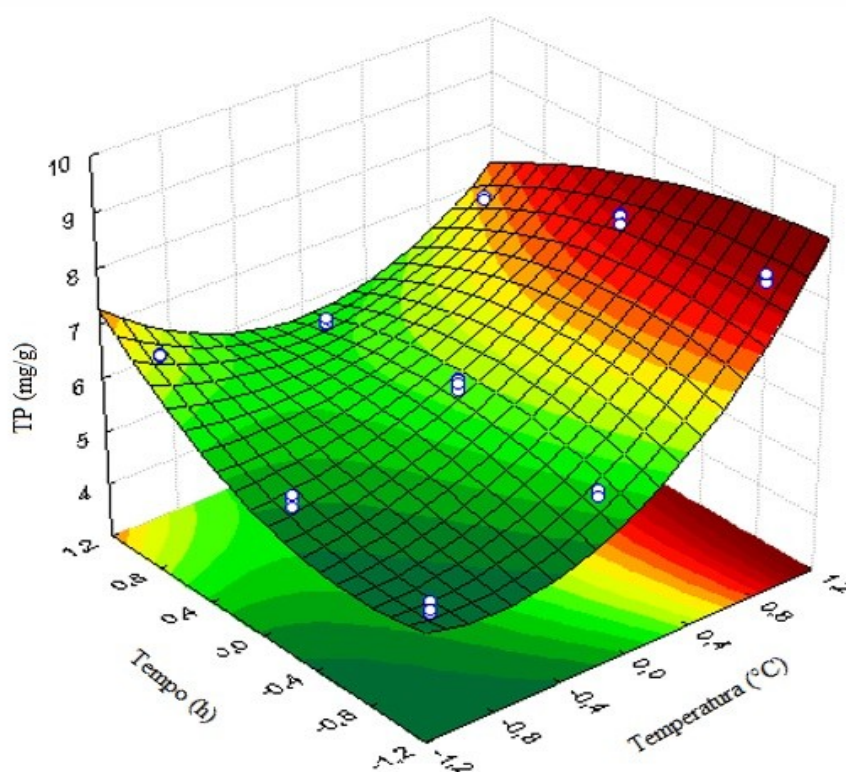
$$TP = 6,17 + 1,39x + 0,497x^2 + 0,106y - 0,387y^2 - 0,696xy - 0,379xy^2 + 0,412x^2y^2$$

(Eq. 11)

Onde: TP = Teor de polissacarídeos, x = Temperatura e y = Tempo

Corroborando com os resultados analisados pelo diagrama de Pareto, o gráfico de Superfície de Resposta (Figura 12) permitiu uma melhor visualização do efeito e interações das variáveis.

Figura 12 - Gráfico de Superfície Resposta obtido pelo planejamento fatorial 32, tendo como fatores a temperatura e o tempo de extração e, como variável resposta o teor de polissacarídeos de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

Legenda: TP – Teor de polissacarídeos. *O grau de significância de cada efeito é visualizado através da inclinação da reta.

Através do Gráfico de Superfície de Resposta (Figura 12), foi possível verificar, o efeito positivo que o tempo e a temperatura exercem isoladamente sobre a extração de polissacarídeos de *T. occidentalis*, através da inclinação da reta para cada um dos parâmetros, sendo a temperatura o fator mais significativo. Já no que diz respeito a interação desses fatores, foi possível constatar que o longo tempo de extração em temperaturas elevadas propiciou uma redução do teor de polissacarídeos, possivelmente devido aos processos de degradação (TAN et al., 2011; TANG et al., 2011; CHEN et al., 2012b).

Por fim, visando assegurar a adequação do modelo, foram realizados testes

para a avaliação da significância do modelo de regressão e para falta de ajuste (Tabela 9).

Tabela 9- Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta obtido a partir do planejamento fatorial 3^2 .

	SS	gl	MS	F
(1) Temperatura (°C)(L)	23,4537	1	23,4537	3873,16
(1) Temperatura (°C)(Q)	4,1979	1	4,1979	693,24
(2) Tempo (h)(L)	0,2024	1	0,2024	33,42
(2) Tempo (h)(Q)	0,0894	1	0,0894	14,77
1L x 2L	5,8191	1	5,8191	960,97
1L x 2Q	0,5748	1	0,5748	94,92
1Q x 2Q	0,3220	1	0,3220	53,18
Falta de ajuste	0,0032	1	0,0032	0,53
Erro puro	0,1453	24	0,0060	
Total SS	34,4001	32		

Legenda: $R^2 = 0,99568$; R^2 ajustado = 0,99447; SS = Soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MS = Média dos quadrados.

O valor de 0,00325 para a falta de ajuste indica que a falta de ajustamento é insignificante em relação ao erro puro, demonstrando que a equação do modelo foi adequada para prever o rendimento da extração dos polissacarídeos dentro da gama de variáveis experimentais. Além disso, a adequação do modelo foi confirmada pelo R^2 . No presente estudo, o valor de R^2 (0,9957) foi próximo de 1,0; o que implica que 99,57% da variabilidade nos dados pode ser explicado pelo modelo; confirmando que o modelo foi altamente significativo. Portanto, levando-se em consideração os resultados apresentados, e que o método de extração ideal deve ser capaz de produzir grandes quantidades de polissacarídeos e não ser destrutivo, com um menor tempo de extração; as condições ótimas evidenciadas pelo modelo foram: temperatura de 95°C e tempo de 4,0 h; com teor médio de $8,30 \pm 0,08$ mg/g.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA DE *T. occidentalis*

A caracterização da solução extrativa de *T. occidentalis* foi realizada para auxiliar no estabelecimento de parâmetros para seu controle de qualidade, estando os resultados sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10- Caracterização da solução extrativa de *T. occidentalis*.

Propriedade	Média
pH	5,12
Densidade relativa	0,91 g/mL
Resíduo seco	2,89 %
Polissacarídeos totais	8,30 mg/g (p/p)

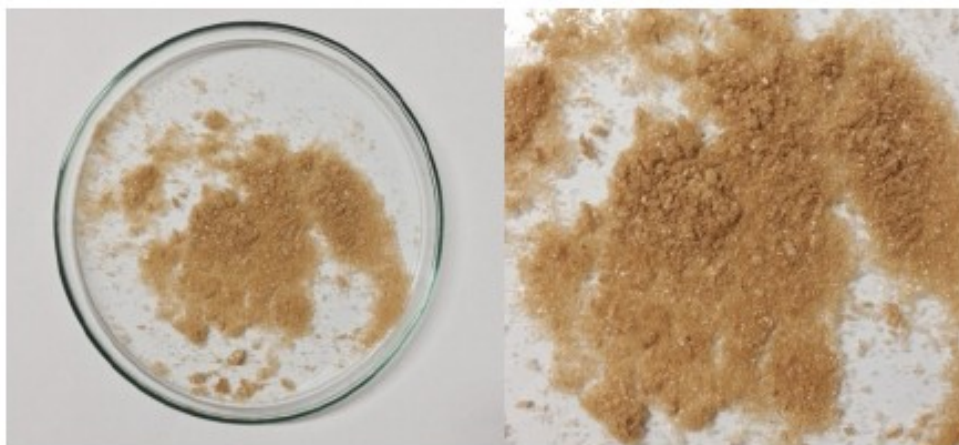
5.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE *T. occidentalis*

A partir do processo de secagem por liofilização da solução extrativa de *T. occidentalis* foi possível obter extrato seco com rendimento de secagem aproximado de 9%. Em seguida, foram realizados ensaios de caracterização, cujos resultados e discussão encontram-se descritos a seguir.

5.5.1 Descrição macroscópica

O extrato seco de *T. occidentalis* apresentou-se visualmente como pó marrom claro, com aspecto brilhoso e odor característico (Figura 13). Além disso, de leve e facilmente aglomerável, devido à higroscopicidade.

Figura 13 - Aspecto macroscópicos do extrato seco de *T. occidentalis*.

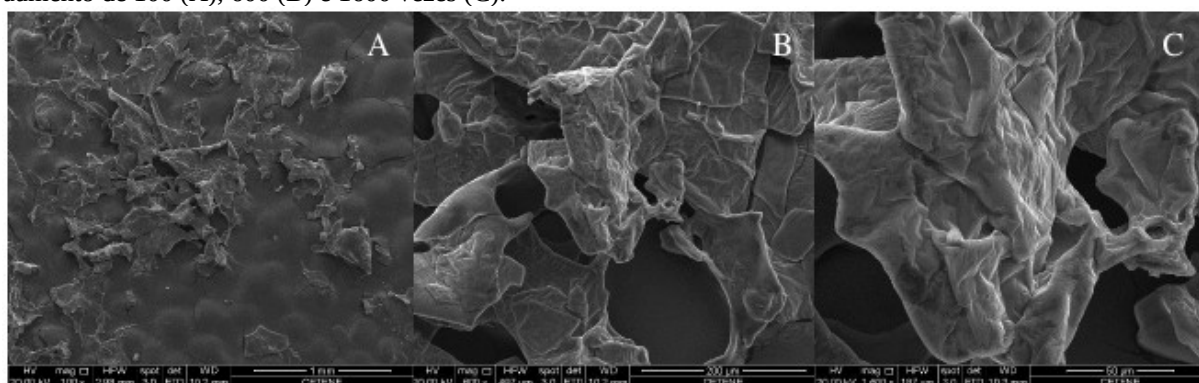


Fonte: Autor

5.5.2 Análise em MEV

O extrato seco de *T. occidentalis* apresentou superfície irregular, aglomerados contínuos e ausência de partículas definidas, conforme demonstrado nas fotomicrografias obtidas por MEV (Figura 14).

Figura 14 - Fotomicrografia, por microscopia eletrônica de varredura, do extrato seco de *T. occidentalis*, sob aumento de 100 (A), 600 (B) e 1600 vezes (C).



Fonte: Autor

5.5.3 Determinação de pH

O pH do extrato seco de *T. occidentalis* disperso em água foi $5,39 \pm 0,01$.

5.5.4 Determinação do tamanho de partícula por granulometria a laser

A avaliação do tamanho de partículas é de extrema importância para a caracterização de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) utilizados no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, tais como comprimidos, tendo em vista que o tamanho dos pós pode interferir nas suas propriedades de fluxo, sendo então um fator crítico para os processos de mistura, compactação e enchimento durante o processamento industrial (SARRAGUÇA, 2010; ONG, 2014).

Conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5^a ed. (2010), a determinação de tamanho de partículas deve ser obtida a partir da retenção destas em tamises com aberturas de malhas distintas, utilizando-se em torno de 25 g de material. No entanto, nota-se que este procedimento é inviável quando dispõe-se de quantidade de amostra inferior ao exigido, sendo possível utilizar alternativamente a granulometria a laser, uma técnica já aplicada e difundida na literatura para caracterização de IFAs (VIEIRA et al., 2013), e eleita como padrão internacional (ISO 13.320-1, 1999), tendo demonstrado correlação com o método farmacopeico supracitado, tal como avaliado por Byung-Man e colaboradores (2008).

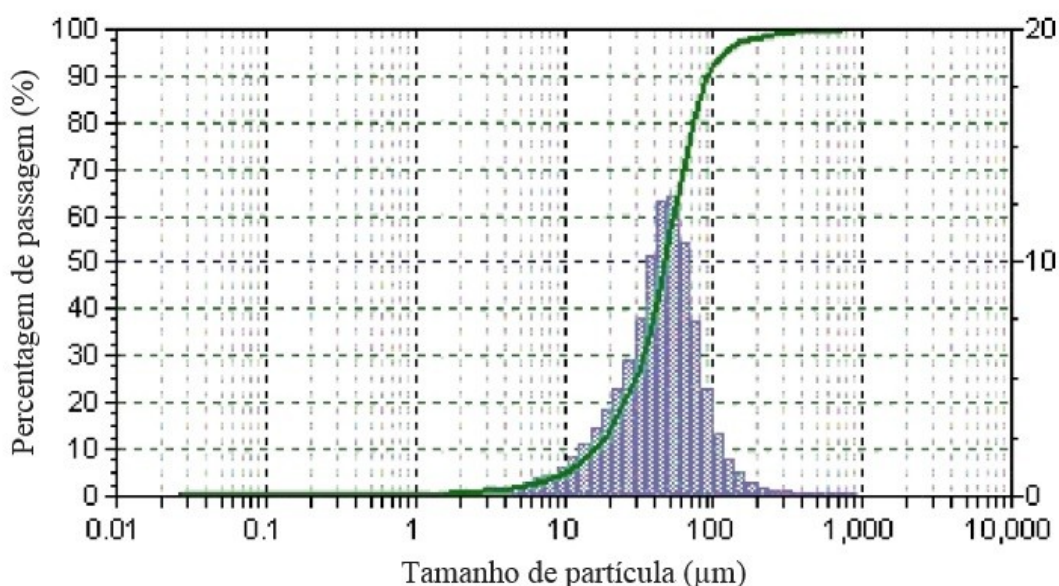
Desta forma, o tamanho de partículas do extrato seco de *T. occidentalis* foi determinado por granulometria a laser, sendo observado, através da figura 15, que houve uma maior concentração de pós correspondentes aos tamanhos de partícula de 87,99 μm (7,4%), 73,99 μm (10,8%), 62,22 μm (12,8%), 52,32 μm (12,6%), 44,00 μm (10,2%), 37,00 μm (7,6%) e 31,11 μm (5,8%); sendo o diâmetro médio das partículas de 56,95 μm .

Se for tomado como base a classificação de tamanho de partícula presente na Farmacopeia Brasileira (2010), o extrato seco de *T. occidentalis* pode ser classificado como um pó fino, uma vez que passou quase em sua totalidade (97,9%)

pelo tamis com abertura nominal de malha de 180 μm .

Levando em consideração que partículas finas apresentam maior propensão à adsorção de umidade e, por conseguinte, podem levar à formação de aglomerados de partículas (BELLAMY; NORDON; LITTLEJOHN, 2008); e que ainda promovem uma maior coesividade dos pós diminuindo suas propriedades de fluxo, e promovendo uma maior fricção entre as partículas (ONG, 2014), verifica-se a necessidade da utilização de excipientes capazes de anular ou mesmo minimizar estas características, para um emprego viável do extrato seco de *T. occidentalis* como IFA no desenvolvimento de medicamentos.

Figura 15 - Distribuição do tamanho de partículas do extrato seco de *T. occidentalis*.



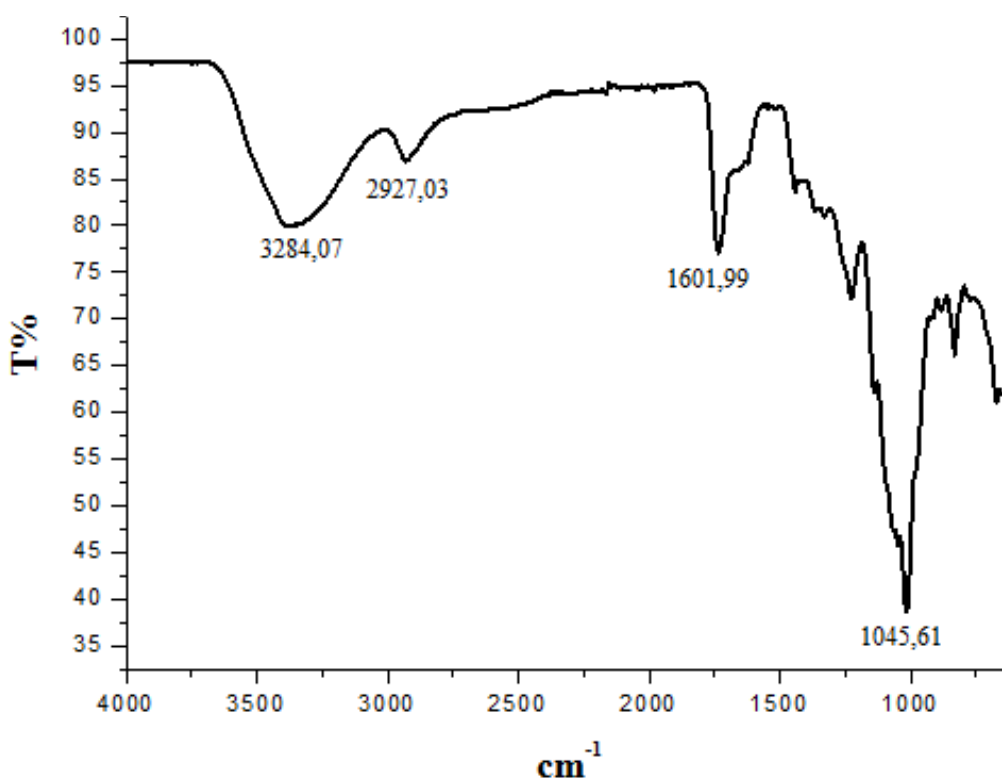
Fonte: Autor

5.5.5 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IV)

O espectro de FT-IR do extrato seco de *T. occidentalis*, demonstrado na Figura 16, apresenta bandas de absorção características dos principais grupos funcionais dos polissacarídeos. Dentre elas, a banda larga em $3.284,07\text{ cm}^{-1}$ é

atribuída ao estiramento axial da ligação entre oxigênio e hidrogênio do grupo OH^- ; enquanto a banda em $2.927,03\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento assimétrico das ligações C-H, estando as bandas de deformação angular na região de 1300 a 1400 cm^{-1} (SANTOS et al., 2010; JIN et al., 2012; MA et al., 2012). Pode-se observar ainda a deformação aromática C=C em $1601,99\text{ cm}^{-1}$ (LIMA, 2012); e a presença de grupos éter, que correspondem às ligações glicosídicas (C-O-C) em bandas com absorção entre 1000 - 1200 cm^{-1} (SANTOS et al., 2010; MA et al., 2012).

Figura 16 - Espectro de infravermelho do extrato seco de *T. occidentalis*.



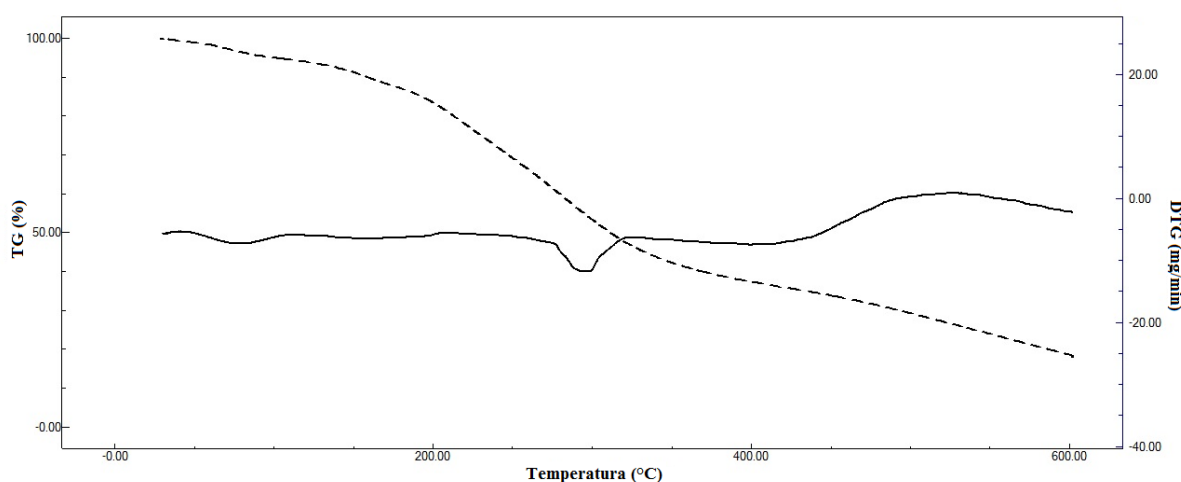
Fonte: Autor

5.5.6 Caracterização térmica

A curva termogravimétrica (TG) do extrato seco de *T. occidentalis* demonstrou

dois eventos de perda de massa; o primeiro referente à perda de água na faixa de 28-95°C ($\Delta m = 4,8\%$), e o segundo à decomposição térmica que se inicia por volta de 120°C, com o percentual de perda de massa total de 81,8% até a temperatura final de 600°C (Figura 17). Este resultado evidencia então a necessidade do controle de temperatura, até cerca de 120°C, no processamento dessa matéria-prima vegetal; de modo que pode ser utilizado para estabelecer parâmetros para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos a partir dessa espécie, ajudando a garantir a sua qualidade e, por conseguinte, a sua segurança e eficácia (FERNANDES et al., 2013; SANTOS, 2013).

Figura 17 - Curvas de TG e DTG do extrato seco de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

5.5.7 Determinação da área superficial específica e porosidade do extrato seco

A determinação da área superficial específica, tamanho e volume de poros é bastante relevante para caracterização física dos materiais particulados (SANTANA et al., 2012). Na indústria farmacêutica, por exemplo, o controle da área figura superficial de fármacos é importante para obtenção de misturas homogêneas de grânulos e pós, assim como para obtenção das propriedades de fluxo necessárias

para produção de cápsulas e comprimidos (SILVA, 2010). Por sua vez, a porosidade também exerce um grande efeito nas propriedades mecânicas dos materiais particulados (resistência à tensão, dureza e deformação); assim como influencia as suas características de dissolução e capacidade de retenção de água (SANTANA et al., 2012).

Levando em consideração a classificação dos poros da IUPAC [microporos (< 20 Å), mesoporos (entre 20 Å e 500 Å) e macroporos (> 500 Å)] (SANTANA et al., 2012), os resultados obtidos neste estudo para o extrato seco de *T. occidentalis* demonstram que o produto analisado possui mesoporos, com área superficial definida de 75,62 m²/g; e volume e tamanho de poro de 0,066 cm³/g e 35,18 Å, respectivamente.

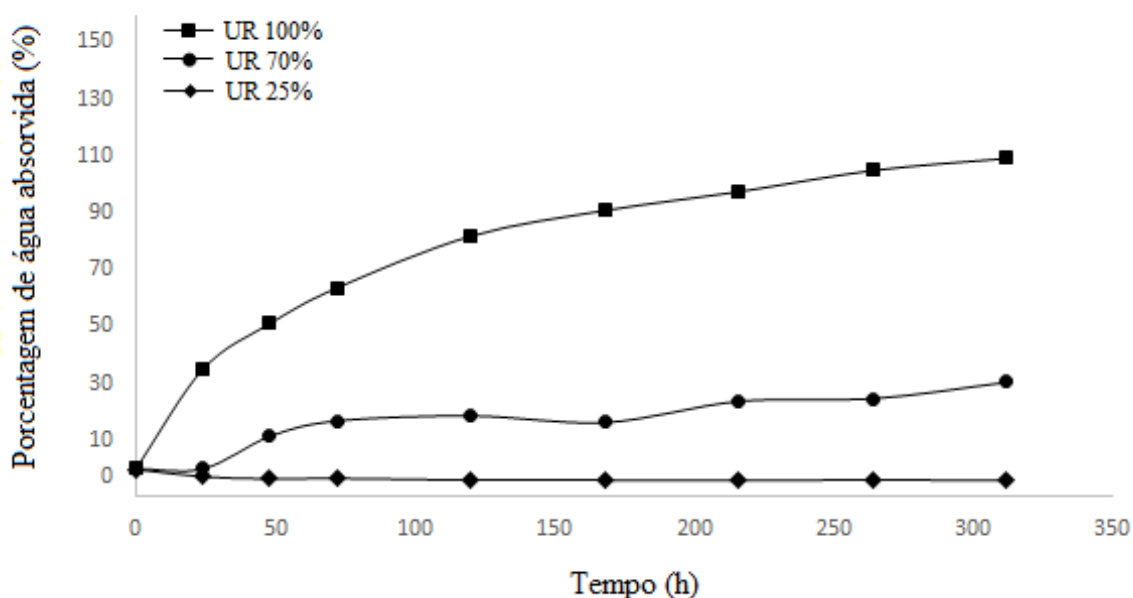
No que diz respeito a molhabilidade, o extrato seco de *T. occidentalis* apresentou características adequadas para ser utilizado como insumo vegetal na obtenção de formas farmacêuticas sólidas (SANTOS, 2010), devido ao tamanho dos poros e elevada área superficial, serem fatores contribuintes para o aumento de sua solubilidade, e consequentemente, biodisponibilidade (SILVA, 2010; SANTOS, 2013).

5.5.8 Determinação da higroscopicidade

Os extratos secos vegetais geralmente são higroscópicos e apresentam baixas propriedades reológicas, de compressibilidade e compactabilidade, fazendo-se necessário o uso de adjuvantes de secagem, a fim de aumentar sua estabilidade físico-química e características tecnológicas (TUYEN; NGUYEN & ROACH, 2010; GALLO et al., 2011). Isto porque teores de umidade acima do especificado podem possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias, a deterioração de constituintes químicos através de reações químicas hidrolíticas e/ou enzimáticas (MARQUES et al., 2012) e alteração das características reológicas do produto que são essenciais no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica sólida (SANTOS, 2013). Por estes motivos, as propriedades higroscópicas do extrato seco de *T. occidentalis*

foram avaliadas pela sorção de água em diferentes condições de umidade (UR de 25, 70 e 100 ± 5 %) e em função do tempo (Figura 18).

Figura 18 - Perfil de higroscopicidade do extrato seco de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

Conforme demonstrado na Figura 18, foi observado que a absorção de água pelas amostras submetidas aos ambientes com UR controlada de 70 e 100 ± 5 %, aumentou em função do teor de umidade e do tempo de exposição, tal como demonstrado por Santos (2013). Enquanto no ambiente com UR 70 ± 5 %, o aumento de massa foi mais 11% nas primeiras 48 h, subindo até 30 % nos dias subsequentes; no ambiente com UR 100 ± 5 , o aumento foi de 35% nas primeiras 24 h, subindo até 109% (Figura 18). Além do aumento de massa, observou-se formação de grumos e leves alterações de cor a partir das primeiras 48 e 24 h para as amostras submetidas à UR de 70 e 100 ± 5 %, respectivamente, reforçando que a absorção de água foi bastante significativa e a necessidade dos adjuvantes de secagem para obtenção de uma matéria-prima padronizada a base de *T. occidentalis*.

Quanto ao ambiente com UR de 25%, houve uma leve redução do peso das amostras, devido à capacidade de sorção de água pela sílica, demonstrando a importância do armazenamento dos extratos seco nessas condições (SANTOS, 2013). Vale salientar, contudo, que os valores de higroscopicidade obtidos não devem ser considerados absolutos, visto que as amostras não estavam acondicionadas em embalagem primária, conforme descrito por Santos (2013).

5.5.9 Determinação de polissacarídeos totais

O teor de polissacarídeos do extrato seco de *T. occidentalis* determinado pelo método de antrona foi de $501,02 \pm 11,77 \mu\text{g/g}$, que equivale a 0,05% de polissacarídeos totais.

5.5.10 Propriedades de compactação, ângulo repouso e tempo de escoamento

O extrato seco de *T. occidentalis* apresentou capacidade de compactação de 11 mL, indicando que o mesmo encontra-se adequado para manipulação de formas sólidas. Isto porque valores acima de 20 mL dificultam enchimento de câmaras ou de cápsulas. Em contrapartida, os índices, FH e IC, avaliados a partir da d_{AP} e d_{CP} (Tabela 11) demonstraram as deficientes propriedades reológicas do extrato seco. Pois para o FH, valores menores que 1,25 indicam bom fluxo; valores maiores que 1,5 indicam fluxo ruim; e valores entre 1,25 e 1,5 exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento (ALVES et al., 2008).

Tabela 11- Propriedade de compactação do extrato seco de *T. occidentalis*.

Propriedade	Média
Densidade aparente	0,250 g/ mL
Densidade compactada	0,345 g/mL
Fator de Hausner (FH)	1,38
Índice de Carr (IC)	27,54 %

É importante destacar que estes índices são determinações pontuais, exprimindo apenas o potencial de compactação/compressão, e não a facilidade ou velocidade com que estas ocorrem. Para este tipo de avaliação, analisamos o ângulo de repouso e o tempo de escoamento. O ângulo de repouso é um parâmetro que tem como finalidade avaliar a dificuldade que um pó tem para fluir livremente através de um orifício para uma superfície livre (ALVES et al., 2008). O resultado encontrado para a tangente entre altura e raio formado pelo escoamento do pó formou um ângulo de 35,18°, com tempo de escoamento infinito. Estes valores indicam que o extrato apresenta baixa propriedade de fluxo para desenvolvimento farmacotécnico. Pois, considera-se que um pó tem boas propriedades de escoamento quando possui ângulo de repouso igual ou inferior a 30°. Enquanto ângulos superiores a 40° sugerem difícil fluxo (ALVES et al., 2008).

5.6 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *T. occidentalis*

A fração polissacarídica de *T. occidentalis* foi liofilizada, apresentando-se como pó leve, de cor levemente amarelada e aspecto brilhoso, conforme demonstrado na Figura 19.

Figura 19 - Aspecto macroscópico da fração polissacarídica liofilizada de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

5.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *T. occidentalis*

A análise estrutural dos polissacarídeos tem recebido muita atenção nos últimos anos, tendo como um dos objetivos a compreensão e correlação com suas ações farmacológicas (SCOPARO et al., 2013). Levando em consideração que a espécie *T. occidentalis* possui diversas propriedades já relatadas na literatura, e que muitas têm sido atribuídas aos polissacarídeos (GOHLA et al., 1992; BODINET et al., 2002; DUBEY; BATRA, 2008a; DUBEY; BATRA, 2008b; DUBEY; BATRA, 2009a; DUBEY; BATRA, 2009b; DUBEY; BATRA, 2009c; TSIRI et al., 2009; SUNILA & HAMSA, 2006; SUNILA; HAMSA; KUTTAN, 2011), avaliamos neste estudo a composição de monossacarídeos presente tanto no extrato seco, como na fração polissacarídica de *T. occidentalis*, através de GC-MS.

Os resultados descritos na Tabela 12 mostram que as amostras apresentaram a mesma composição de monossacarídeos, embora com percentuais distintos. Enquanto no extrato seco foi predominante a presença de glicose, seguida de

manose e arabinose; na fração polissacarídica destacou-se a manose, seguida de arabinose e glicose. É possível que estas variações sejam provenientes da natureza das amostras, tendo em vista que a fração polissacarídica possui menos interferentes relacionados a outros metabólitos, os quais, estão presentes de forma heterogênea no extrato. Estes resultados inéditos poderão então ser utilizados como base para realização de estudos mais aprofundados acerca da análise estrutural dos polissacarídeos presentes em *T. occidentalis*.

Tabela 12- Teor de monossacarídeos do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis*

Monossacarídeo/amostra	Extrato seco (%)	Fração polissacarídica (%)
Ramnose	11,3	9,0
Fucose	0,0	0,0
Arabinose	12,7	22,7
Xilose	0,0	0,0
Manose	17,6	35,3
Galactose	7,8	12,0
Glicose	50,6	21,2

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULANTE DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *T. occidentalis*

5.8.1 Avaliação de citotoxicidade

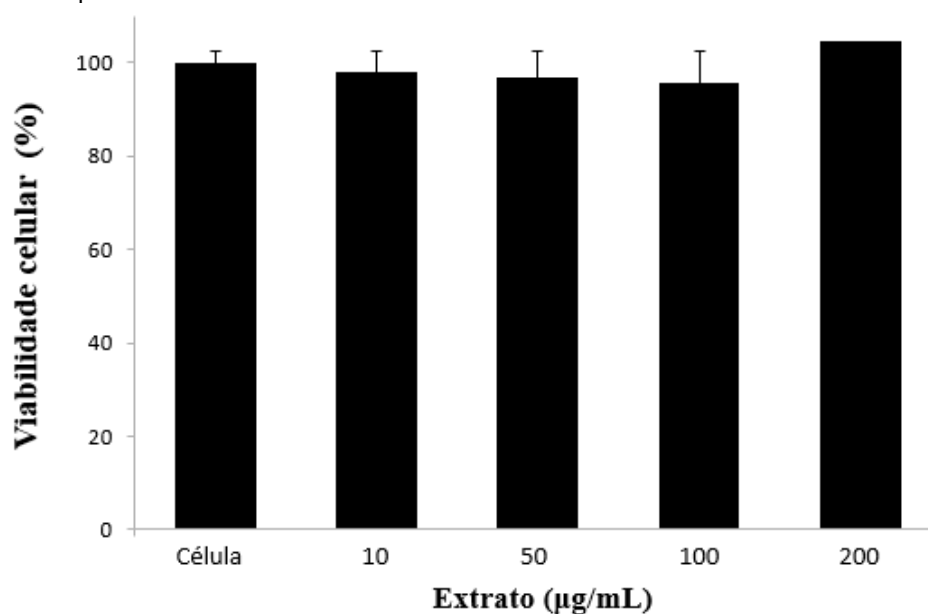
Para avaliação da citotoxicidade foram testados extratos e frações aquosos em variadas concentrações, tanto em esplenócitos de Balbs, quanto em PBMCs, onde através da técnica de MTT, observaram-se resultados promissores.

Na figura 20, pode-se verificar que o tratamento utilizando o extrato de *T. occidentalis* foi benéfico para a manutenção da vida nas PBMCs, em função de todas as concentrações dos extratos demonstrarem-se atóxicas quando comparado ao controle, resultando em viabilidade celular superior a 95% para todas as

concentrações testadas.

Adicionalmente, é perceptível notar que com a elevação da concentração do extrato aquoso, ocorre uma diminuição da viabilidade celular, porém o mesmo não é representado na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, pois apresentou uma média de viabilidade de 104,54%, resultando no melhor efeito positivo, enquanto que na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, é constado a média mais baixa do grupo de concentrações com 95,77%.

Figura 20 - Avaliação da citotoxicidade em cultura de PBMCs após exposição ao extrato seco de polissacarídeos de *T. occidentalis*.



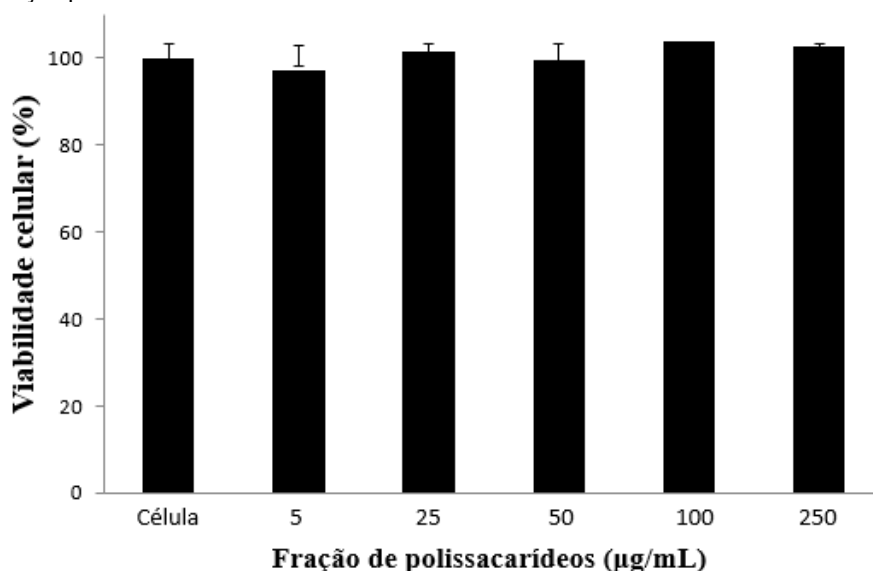
Fonte: Autor

Legenda: Avaliação de citotoxicidade por MTT em cultura de PBMCs após 48 h de exposição ao extrato seco de *T. occidentalis*. O controle negativo utilizado corresponde apenas às células em meio de cultura.

Da mesma forma, também constatou-se que houve similaridade entre os resultados verificados tanto para o extrato aquoso, como também para a fração rica em polissacarídeos. Na figura 21, estão representados os resultados mensurados do efeito protetor decorrente do contato das PBMCs com a fração polissacarídica. Evidenciando que a fração polissacarídica de *T. occidentalis* não promove dano

significativo às células, uma vez que todas as concentrações apresentaram média de viabilidade superior a 95%, com destaque para a concentração de 100 µg/mL que promoveu uma sobrevivência celular de 103,98% quando comparado ao controle. Semelhantemente, o menor estímulo por parte da fração, conservou-se bastante elevada, em virtude de 5 µg/mL de fração, ter sido suficiente para incitar uma viabilidade de 97,17%.

Figura 21 - Avaliação da citotoxicidade em cultura de PBMCs após exposição a fração polissacarídeos de *T. occidentalis*.



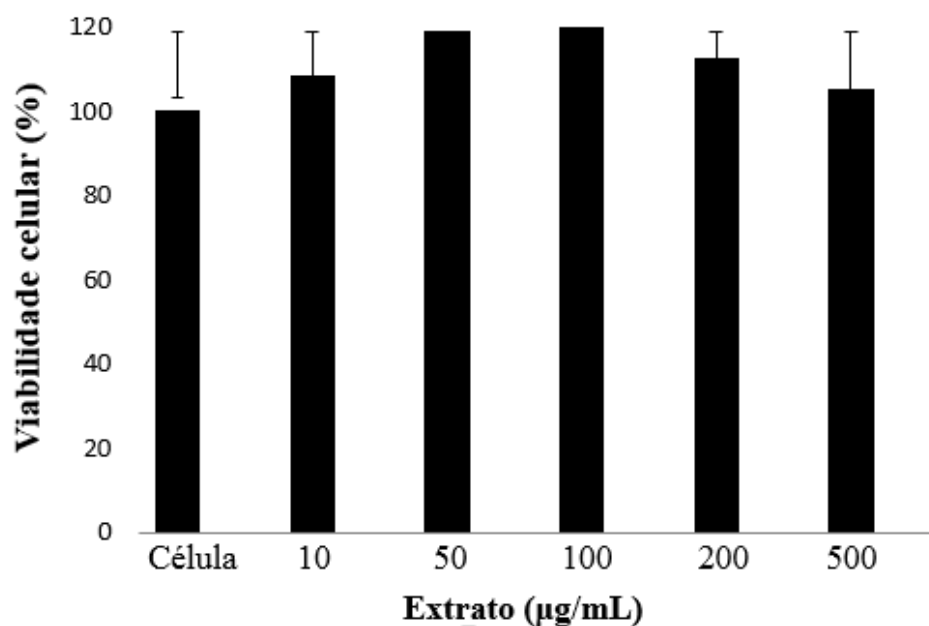
Fonte: Autor

Legenda: Avaliação de citotoxicidade por MTT em cultura de PBMCs após 48 h de exposição à fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*. O controle negativo utilizado corresponde apenas às células em meio de cultura.

Outrossim, os ensaios de citotoxicidade realizados em esplenócitos de BALBs, também se comportaram de forma semelhante ao ocorrido nas PBMCs. Conforme os resultados expostos nas Figuras 22 (extrato seco) e 23 (fração de polissacarídeos), foi observado que todas as amostras propiciaram superior viabilidade celular em relação ao controle. Enquanto que para o extrato (figura 22), o aumento da viabilidade apresentou-se acima de 105% para todas as concentrações

testadas, com maior percentual apresentado para a amostra de 100 µg/mL (120%); para a fração (figura 23), o aumento foi superior a 118%, sendo o maior percentual apresentado para a amostra de 100 µg/mL (129%).

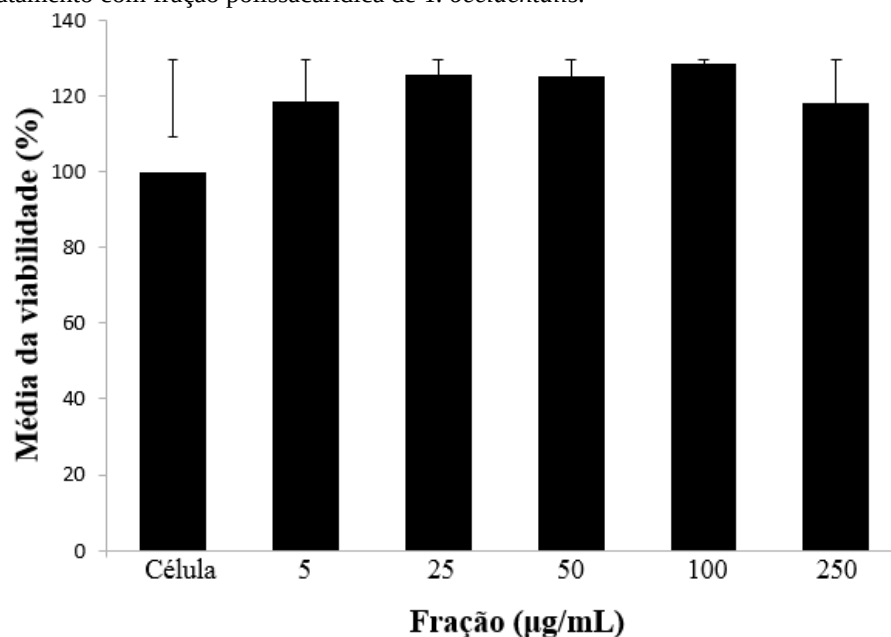
Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos de BALBs após pré-tratamento com extrato seco de *T. occidentalis*



Fonte: Autor

Legenda: Avaliação de citotoxicidade por MTT em cultura de esplenócitos de BALBs após 48 h de exposição ao extrato seco de *T. occidentalis*. O controle negativo utilizado corresponde apenas às células em meio de cultura.

Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos de BALBs após pré-tratamento com fração polissacarídica de *T. occidentalis*.



Fonte: Autor

Legenda: Avaliação de citotoxicidade por MTT em cultura de esplenócitos de BALBs após 48 h de exposição à fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*. O controle negativo utilizado corresponde apenas às células em meio de cultura.

Estes resultados indicam, portanto, que tanto o extrato seco, como as frações de polissacarídeos de *T. occidentalis*, em todas as concentrações testadas, não apresentaram toxidez ao microambiente celular, sendo então utilizadas na avaliação imunoestimulante, descrita a seguir.

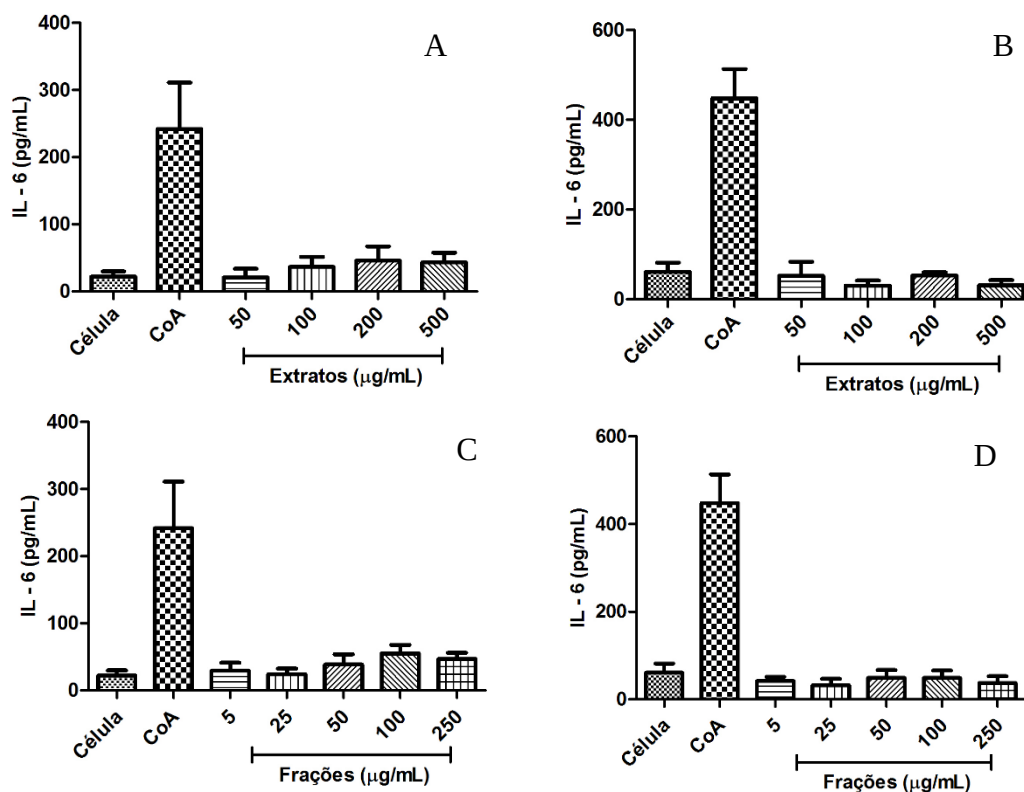
5.8.2 Determinação de citocinas

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune, sendo sua produção desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos ou tumores (BILATE, 2007; TONET, 2008). Existem citocinas que funcionam primariamente como indutoras de inflamação (citocinas pró-inflamatórias), sejam as derivadas de

células da resposta imune inata, como é o caso da IL-6 e IL-1 β , ou de células de padrão Th1: IL-2 e IFN- γ ou Th17: IL-17A e IL-22; enquanto outras atuam na contra-regulação (citocinas anti-inflamatórias), sintetizadas principalmente por células do perfil Th2: IL-6 e IL-10 (IVANOV et al, 2006; CIANCIARULLO et al., 2008; ORSATTI, 2009). No presente estudo, a modulação de IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-10 pelo extrato e fração polissacarídica de *T. occidentalis* foi avaliada pelo teste ELISA em culturas de esplenócitos de BALBs; enquanto a modulação de IL-1 β , IL-6, IL-2 e IFN- γ foi avaliada pelo teste ELISA em culturas de PBMCs.

Para a IL-6 (Figura 24) foi demonstrada modulação positiva tanto pelo extrato, como pela fração polissacarídica, para todas as concentrações testadas, sendo a maior expressão determinada para o extrato na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h (45,9 pg/mL – Figura 24A) e 48 h (53,6 pg/mL – Figura 24B) de exposição; e para a fração na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h (55,0 pg/mL – Figura 24C) e de 50 $\mu\text{g/mL}$ 48 h (49,3 pg/mL – Figura 24D), contudo vale ressaltar que não houve significância estatística.

Figura 24 - Determinação de IL-6 em cultura de esplenócitos de BALB após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*.



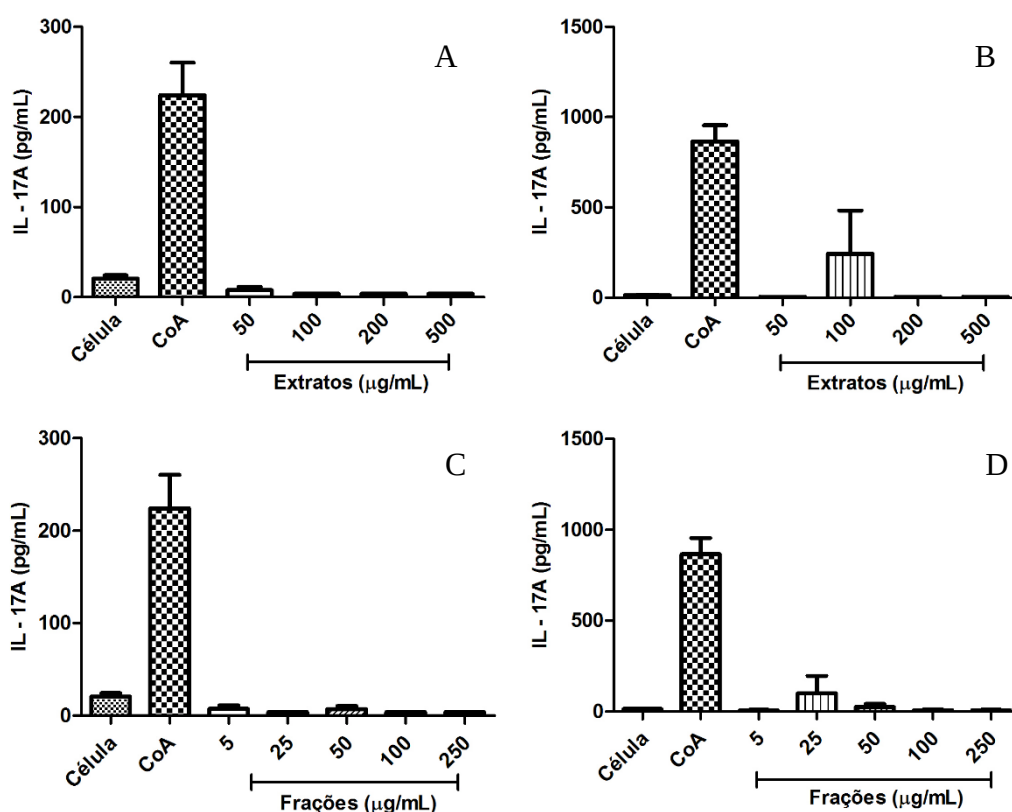
Fonte: Autor

Legenda: Determinação de IL-6 em cultura de esplenócitos de BALB após 24 h (A) e 48 h (B) de exposição ao extrato seco; e após 24 h (C) e 48 h (D) de exposição à fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*; IL-6 – Interleucina 6; CoA – Concavalina. A análise estatística foi realizada utilizando teste t *Student*, duas vias (*Mann Whitney test*). Não houve significância estatística para todas as amostras ($p > 0,05$).

Para a IL-17A, conforme pode ser observado na Figura 25, não houve modulação positiva, exceto para o extrato na concentração de 100 μg/mL (243,6 pg/mL – Figura 25B) e para a fração na concentração de 25 μg/mL (100,2 pg/mL – Figura 25D) após 48h de exposição às amostras, embora sem significância estatística. A IL-17A é um membro família IL-17 (IL-17 ou IL-17A, IL-17B, -17C, -17D, -17E ou -25, -17F (NORMANTON; MARTI, 2013), tendo sido escolhida para este estudo em virtude de ser a mais comumente associada à linhagem Th17 e, não raro,

referida apenas como IL-17 (KORN et al., 2009). Vários autores relataram que a IL-17A tem um papel na proteção de organismos contra bactérias e fungos extracelulares devido a sua capacidade de recrutar neutrófilos para as áreas infectadas (YE ET AL., 2001; LOONG ET AL., 2002; WEAVER ET AL., 2007; MARTI ET AL., 2009; NORMANTON; MARTI, 2013). Mas, em virtude dos resultados pouco expressivos demonstrados neste estudo, sugere-se que o extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* não exerçam uma modulação significativa sobre a IL-17A.

Figura 25 - Determinação de IL-17A em cultura de esplenócitos de BALB após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*.



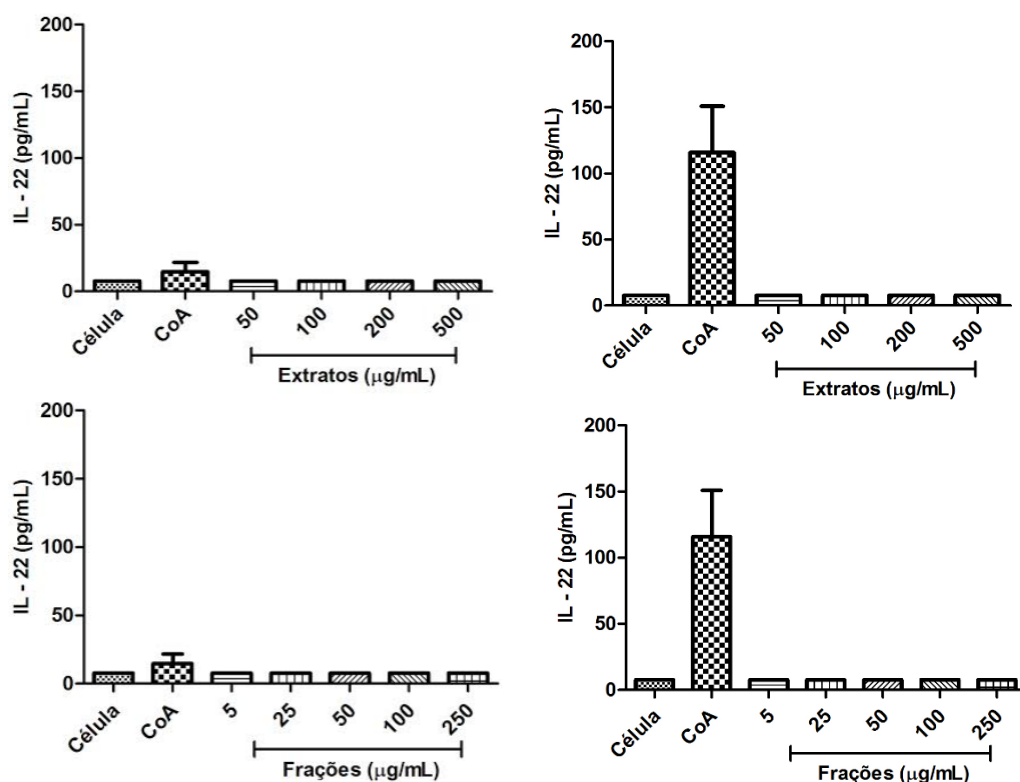
Fonte: Autor

Legenda: A – Determinação de IL-17A em cultura de esplenócitos de BALB após 24 h (A) e 48 h (B) de exposição ao extrato seco; e após 24 h (C) e 48 h (D) de exposição à fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*; IL-17A – Interleucina 17A; CoA – Concanavalina. A análise estatística foi realizada utilizando teste t *Student*, duas vias (*Mann Whitney test*). Não houve significância estatística para

todas as amostras ($p>0,05$).

Já para a IL-22 (Figura 26), outra citocina expressa em células Th17, não foi demonstrada modulação positiva significativa para nenhuma amostra, em nenhum tempo avaliado, sendo a expressão da citocina (7,8 pg/mL) próxima ao seu limite inferior de detecção (3,9 pg/mL). A IL-22 é uma citocina pró-inflamatória conhecida por ativar células epiteliais, fortalecendo, assim, o sistema imune do hospedeiro contra patógenos bacterianos (ZHENG et al., 2008). No entanto, foi comprovado uma fraca atuação dessas amostras sobre esta citocina.

Figura 26 - Determinação de IL-22 em cultura de esplenócitos de BALB após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*.



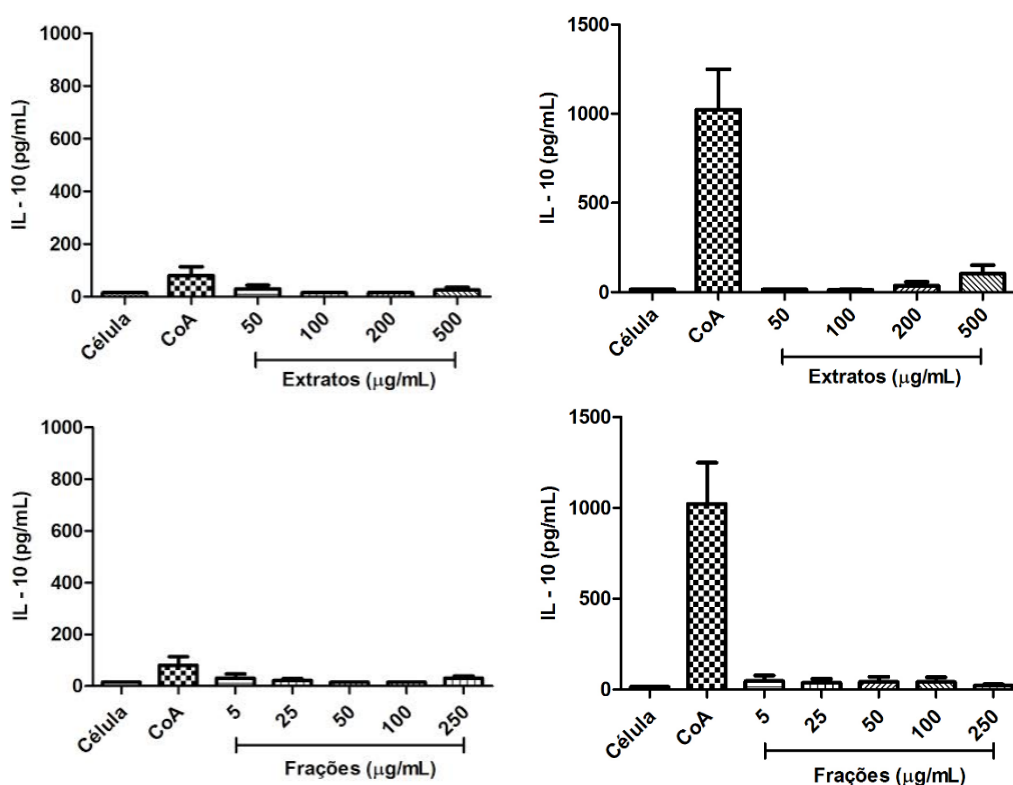
Fonte: Autor

Legenda: A – Determinação de IL-22 em cultura de esplenócitos de BALB após 24 h (A) e 48 h (B) de exposição ao extrato seco; e após 24 h (C) e 48 h (D) de exposição à fração de polissacarídeos de *T.*

occidentalis; IL-22 – Interleucina 22; CoA – Concanavalina. A análise estatística foi realizada utilizando teste t *Student*, duas vias (*Mann Whitney test*). Não houve significância estatística para todas as amostras ($p>0,05$).

Por sua vez, a expressão de IL-10 (Figura 27) também não foi significativa para nenhuma das amostras. O efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como as ILs-2 e -12 (citocinas pró-inflamatórias). Além disso também atua inibindo a proliferação de células Th1 e diminuindo sua função citolítica e secretora de citocinas; facilitando assim o desenvolvimento de respostas via Th2 (THOMPSON-SNIPES et al., 1991).

Figura 27 - Determinação de IL-10 em cultura de esplenócitos de BALB após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*.

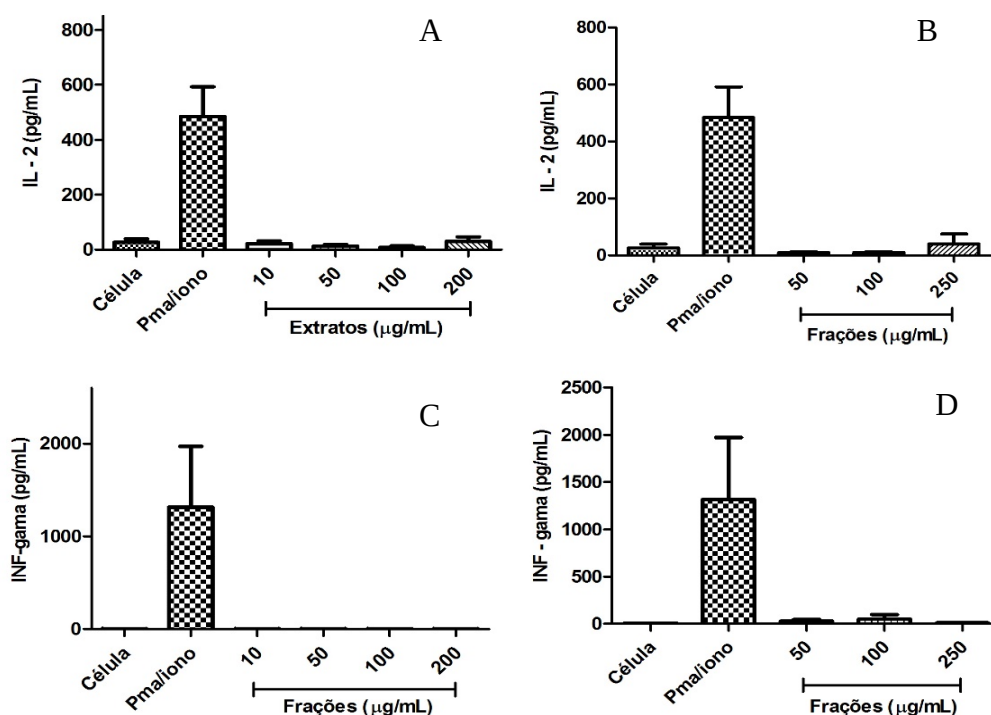


Legenda: A – Determinação de IL-10 em cultura de esplenócitos de BALB após 24 h (A) e 48 h (B) de exposição ao extrato seco; e após 24 h (C) e 48 h (D) de exposição à fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*; IL-10 – Interleucina 10; CoA – Concanavalina. A análise estatística foi realizada utilizando

teste t *Student*, duas vias (*Mann Whitney test*). Não houve significância estatística para todas as amostras ($p > 0,05$).

No que diz respeito aos resultados do perfil de modulação de IL-2 e INF- γ em PBMCs pelo extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* não houve aumento significativo da expressão destas citocinas pró-inflamatórias, como pode ser observado, na Figuras 28. Contudo vale ressaltar que para a IL-2 houve apenas uma discreta expressão para a fração na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (40,66 pg/mL – Figura 28B), embora sem significância estatística. Estas duas citocinas desempenham um importante papel na regulação da resposta imunológica celular, desempenhando funções efectoras da resposta imunológica de ativação e proliferação celular, ações características de células do perfil Th1 de linfócitos auxiliares. Além disso, a INF- γ em associação com a IL-2, tem a capacidade de ativar células CD8+, as quais têm como principal função a atividade citotóxica antígeno-específica (TONET, 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

Figura 28 - Determinação de IL-2 e INF- γ em cultura PBMCs após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*.

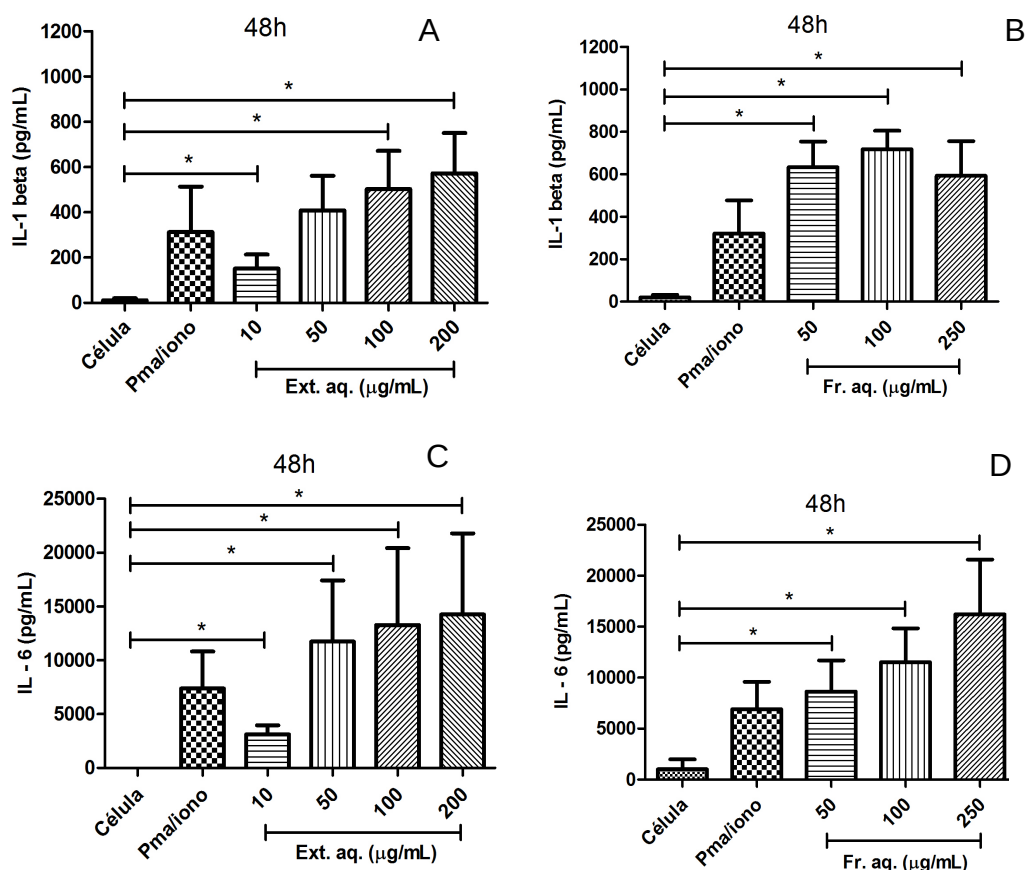


Legenda: Determinação de IL-2 em cultura de PBMCs após 48 h de exposição ao extrato seco (A) e fração polissacarídica (B) de *T. occidentalis*; Determinação de IFN- γ em cultura de PBMCs após 48 h de exposição ao extrato seco (C) e fração polissacarídica (D) de *T. occidentalis*; IL-2 – Interleucina 2; IFN- γ – Interferon gama; PMA – *Phorbol 12 myristate 13 acetate*. A análise estatística foi realizada utilizando teste t *Student*, duas vias (*Mann Whitney test*). Não houve significância estatística para todas as amostras ($p > 0,05$).

Já para os resultados do perfil de modulação de IL-1 β e IL-6 em PBMCs foi evidenciado um aumento de expressão, estatisticamente significativo, para todas as concentrações testadas da fração de polissacarídeos, como pode ser observado, na Figura 29, sendo a maior expressão determinada para a concentração de 100 μ g/mL para IL-1 β (718,79 pg/mL – Figura 29B) e de 250 μ g/mL para IL-6 (16.224,8 pg/mL – Figura 29D). Em relação ao extrato foi verificada esta modulação expressiva para as concentrações de 10, 100 e 200 μ g/mL na determinação de IL-1 β , sendo a maior expressão na concentração de 200 μ g/mL (572,24 pg/mL – Figura 29A) e 50 μ g/mL (11.747,3 pg/mL – Figura 29B), 100 μ g/mL (13.276,5 pg/mL – Figura 29B) e 200

$\mu\text{g/mL}$ na determinação de IL-6 (14.269,4 pg/mL – Figura 29B).

Figura 29 - Determinação de IL-1 β e IL-6 em cultura PBMCs após exposição ao extrato seco e fração de polissacarídeos de *T. occidentalis*.



Legenda: Determinação de IL-1 β em cultura de PBMCs após 48 h de exposição ao extrato seco (A) e fração polissacarídica (B) de *T. occidentalis*; Determinação de IL-6 em cultura de PBMCs após 48 h de exposição ao extrato seco (C) e fração polissacarídica (D) de *T. occidentalis*; IL-1 β – Interleucina 1 β ; IL6 – Interleucina 6; PMA – *Phorbol 12 myristate 13 acetate*. A análise estatística foi realizada utilizando teste t *Student*, duas vias (*Mann Whitney test*). Houve significância estatística para todas as amostras da fração de polissacarídeos ($p < 0,05$) e para o extrato seco nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (IL-1 β) e 100-200 $\mu\text{g/mL}$ (IL-6).

Estes resultados indicam uma importante ação destas amostras na imunidade inata, tendo em vista que a IL-1- β é reconhecida como uma citocina pró-inflamatória fundamental, secretada principalmente por macrófagos (LEE et al., 2012), tendo

como uma de suas principais funções na resposta inflamatória a indução da síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda. Além disso, também atua recrutando neutrófilos e induzindo a expressão de molécula de adesão endotelial, sendo este, um mecanismo essencial para a adesão de leucócitos na superfície endotelial e posterior migração para os tecidos (ORSATTI, 2009).

Somado a isto, estes dados ainda indicam que as amostras podem apresentar uma ação relevante no controle da imunidade, devido as funções da IL-6. Esta citocina atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, sendo sintetizada por várias células (macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos, músculo-esqueléticas, dentre outras), e associada ao controle e coordenação de respostas do sistema imunológico, além de atuar nos sistemas hematopoiético, nervoso e endócrino e participar do metabolismo ósseo. Na imunidade inata, ela estimula a síntese de proteínas da fase aguda pelo fígado, atuando na resposta de fase aguda. Entretanto, na imunidade adaptativa, ela estimula o crescimento de células B, que se diferenciam em produtoras de anticorpos, e estimula a proliferação e ativação das células T (ORSATTI, 2009). Além disso, sugere-se que uma das principais funções da IL-6 seja a auto-limitação da resposta inflamatória, tendo em vista que exerce ação inibidora na expressão das citocinas pró-inflamatórias. Assim, a IL-6 concomitantemente regula atividades pró- e anti-inflamatórias, contribuindo tanto para o desenvolvimento quanto para a resolução da resposta inflamatória (ORSATTI, 2009). Diante dos resultados apresentados, constatou-se que o extrato seco e a fração polissacarídica de *T. occidentalis* exerceram modulação positiva significativa para as ILs -1 β e -6, indicando que podem atuar como importantes reguladores do sistema imune.

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SECO E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *T. occidentalis*

5.1.1 Sequestro do radical DPPH•

A capacidade de sequestro do radical DPPH• pelo extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* foi avaliada. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as amostras, em todas as concentrações empregadas (0,9 a 7,2 µg/mL), reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) a concentração do radical DPPH• (sistema), conforme demonstrado na Tabela 13 para o extrato seco e para a fração polissacarídica. De acordo com esse método, o sequestro do radical DPPH• pode ocorrer pela transferência de átomos de hidrogênio formando moléculas estáveis de DPPH₂ (MUSA et al., 2013).

Tabela 13- Potencial antioxidante *in vitro* do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* no sequestro do radical DPPH•.

Concentrações (µg/mL)	Sequestro do Radical DPPH• (%) ± dp		
	Extrato seco de <i>T.</i>	Fração	Trolox®
	<i>occidentalis</i>	polissacarídica	
Controle	2,20 ± 0,15	2,20 ± 0,15	2,20 ± 0,15
Sistema	100*	100*	100*
0,9	47,05 ± 0,72 ^{ab}	20,19 ± 0,41 ^{ab}	29,89 ± 0,65 ^a
1,8	48,97 ± 0,70 ^a	26,02 ± 0,93 ^{ab}	48,36 ± 0,65 ^a
3,6	52,28 ± 2,57 ^{ab}	35,79 ± 4,08 ^{ab}	62,28 ± 1,92 ^a
5,4	60,90 ± 2,47 ^{ab}	46,14 ± 2,10 ^{ab}	76,10 ± 0,76 ^a
7,2	72,94 ± 2,18 ^{ab}	50,83 ± 2,71 ^{ab}	89,34 ± 0,32 ^a
CE ₅₀	1,64	7,02	1,93

Os valores representam a média ± desvio padrão (dp) dos valores de inibição *in vitro*, dos experimentos em duplicata (n = 3). * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao sistema (100% de radical DPPH•) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). ^b $p < 0,05$ em relação ao Trolox® (0,9-7,2 µg/mL) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Quando os resultados foram comparados com o padrão Trolox® nas mesmas concentrações avaliadas (0,9-7,2 µg/mL) (Tabela 13), foi verificado que apesar do extrato seco, nas concentrações de 3,6-7,2 µg/mL, ter apresentado resultado inferior e estaticamente diferente em relação ao Trolox®, foi possível observar que não houve diferença significativa para o resultado na concentração de 1,8 µg/mL, e que o sequestro do radical DPPH• na concentração de 0,9 µg/mL foi significativamente maior. De modo que sua CE₅₀ (1,64 µg/mL) foi inferior à do padrão (1,93 µg/mL).

Já para a fração polissacarídica, foi possível observar que os resultados antioxidantes foram inferiores e significativamente diferentes dos resultados apresentado pelo Trolox® nas mesmas concentrações; e que o extrato seco apresentou uma maior capacidade antioxidante do que a fração polissacarídica. Pois, além de apresentar um maior percentual de inibição do radical DPPH•, sua CE₅₀ (1,64 µg/mL) foi 4 vezes inferior em relação à CE₅₀ da fração (7,02 µg/mL). Isto indica que apesar dos polissacarídeos exercerem uma atividade antioxidante significativa em relação ao sistema empregado, outras substâncias presentes no extrato de *T. occidentalis* podem estar atuando em sinergia com os polissacarídeos. Uma situação que não é incomum quando se trata de extratos vegetais, tendo em vista que as plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas que atuam biologicamente em conjunto, constituindo o que se conhece como fitocomplexo, de tal maneira que o isolamento de princípios ativos não reproduz obrigatoriamente o efeito desse conjunto de substâncias (KLEIN et al., 2009).

5.1.2 Sequestro do radical ABTS•⁺

No presente estudo, o efeito do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* no sequestro do radical ABTS•⁺ foi avaliado, estando os resultados apresentados na Tabela 14. Embora o mecanismo de sequestro do ABTS•⁺ possa ocorrer de modo similar ao do DPPH•, através da transferência de átomos de hidrogênio ou elétrons, formando moléculas estáveis de ABTS•⁺ (NIKI, 2010), os

resultados obtidos neste método demonstraram um maior potencial antioxidante tanto para o extrato seco, como para a fração polissacarídica (Tabela 14), com redução de forma significativa ($p < 0,05$) da concentração da solução de radical ABTS^{•+} (sistema) em todas as concentrações avaliadas (0,9 a 7,2 µg/mL).

Foi verificado ainda que o extrato seco demonstrou ser um potente antioxidante, tendo apresentado uma CE₅₀ (1,18 µg/mL) inferior à do Trolox[®] (1,65 µg/mL), além de ter exibido um maior percentual de remoção do radical ABTS^{•+}, em todas as concentrações avaliadas, sendo observada uma significância estatística para as concentrações de 1,8-5,4 µg/mL (Tabela 14). Para a fração polissacarídica não houve diferença significativa da capacidade antioxidante em relação ao Trolox[®], nas concentrações de 0,9-1,8 µg/mL. Contudo, considerando as demais concentrações (3,6-7,2 µg/mL), a fração não representou, em sua totalidade, a atividade do extrato, reforçando a ideia de que outros compostos possam estar presentes atuando como antioxidantes, assim como demonstrado no método do DPPH[•].

Tabela 14- Potencial antioxidante *in vitro* do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* no sequestro do radical ABTS^{•+}.

Concentrações (µg/mL)	Sequestro do Radical ABTS ^{•+} (%) ± dp		
	Extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	Fração polissacarídica	Trolox [®]
Controle Sistema	2,20 ± 0,15 100*	2,20 ± 0,15 100*	2,20 ± 0,15 100*
0,9	44,42 ± 0,62 ^a	42,57 ± 3,77 ^a	37,31 ± 0,63 ^a
1,8	58,91 ± 1,20 ^{ab}	49,65 ± 1,60 ^a	50,35 ± 0,72 ^a
3,6	75,70 ± 0,94 ^{ab}	54,97 ± 0,99 ^{ab}	65,85 ± 0,65 ^a
5,4	85,37 ± 0,64 ^{ab}	63,53 ± 0,47 ^{ab}	76,13 ± 0,17 ^a
7,2	88,95 ± 1,98 ^a	71,62 ± 0,65 ^{ab}	84,96 ± 0,21 ^a
CE ₅₀	1,18	1,86	1,65

Os valores representam a média ± desvio padrão (dp) dos valores de inibição *in vitro*, dos experimentos em duplicata (n = 3). * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao sistema (100% de radical ABTS^{•+}) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). ^b $p < 0,05$

em relação ao Trolox® (0,9-7,2 µg/mL) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

5.1.3 Inibição da peroxidação lipídica – método de determinação de TBARS

No presente estudo a capacidade antioxidante do extrato seco e fração de polissacarídeos de *T. occidentalis* na inibição da peroxidação lipídica foi realizada *in vitro* utilizando homogenato da gema do ovo como fonte de lipídeos, sendo a oxidação dos ácidos graxos insaturados induzida pelo AAPH.

De acordo com os resultados obtidos, tanto o extrato seco quanto a fração polissacarídica (Tabela 15), em todas as concentrações testadas, (0,9 a 7,2 µg/mL), inibiram a peroxidação lipídica de forma significativa ($p < 0,05$), através da ação antioxidante sobre os radicais peróxilas gerados pelo AAPH e subsequente redução dos níveis de TBARS em relação ao grupo AAPH sem as amostras em estudo (sistema).

Tabela 15- Potencial antioxidante *in vitro* e do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* na inibição da peroxidação Lipídica pela diminuição dos níveis de TBARS.

Concentrações (µg/mL)	Inibição da Peroxidação Lipídica (%) ± dp		
	Extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	Fração polissacarídica	Trolox®
Controle	2,20 ± 0,15	2,20 ± 0,15	2,20 ± 0,15
AAPH	100*	100*	100*
0,9	51,42 ± 0,93 ^{ab}	46,88 ± 0,78 ^{ab}	60,89 ± 0,62 ^a
1,8	60,19 ± 0,14 ^a	57,79 ± 0,74 ^{ab}	63,63 ± 0,82 ^a
3,6	61,33 ± 0,57 ^{ab}	60,66 ± 0,32 ^{ab}	67,33 ± 0,63 ^a
5,4	62,60 ± 0,12 ^{ab}	60,16 ± 0,30 ^{ab}	71,03 ± 0,49 ^a
7,2	68,77 ± 1,05 ^{ab}	63,70 ± 2,38 ^{ab}	74,84 ± 0,52 ^a
CE ₅₀	0,67	1,05	0,22

Os valores representam a média ± desvio padrão (dp) dos valores de inibição *in vitro*, dos experimentos em duplicata (n = 3). * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação ao AAPH (100% de TBARS) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). ^b $p < 0,05$ em relação ao Trolox® (0,9-7,2 µg/mL) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Quando os resultados foram comparados com o padrão Trolox® nas mesmas concentrações avaliadas (0,9-7,2 µg/mL) (Tabela 15), foi verificado que tanto o extrato seco como a fração polissacarídica apresentaram uma menor capacidade antioxidante (Tabela 15). Apenas na concentração de 1,8 µg/mL para o extrato seco não foi observado diferença significativa em relação ao Trolox® na mesma concentração. Contudo, apesar da resposta inferior ao padrão, foi possível observar que as amostras, sobretudo o extrato seco, exibiram percentuais de inibição da peroxidação lipídica próximos aos do Trolox®, além de baixas concentrações para redução dos níveis de TBARS em 50%.

Da mesma forma que para *T. occidentalis*, vários extratos de plantas medicinais têm demonstrado efeito inibitório contra a peroxidação lipídica pelo método de produção de TBARS (LIMA et al., 2006; COSTA et al., 2012, JIN et al., 2013; SANTANA et al., 2013). Esses resultados são bastante promissores, uma vez que peroxidação lipídica é um processo envolvido em muitos eventos patológicos e que vários estudos têm demonstrado que os níveis de malonaldeído (MDA), frequentemente medido como TBARS, são elevados em associação com fatores de risco cardiovascular, hipertensão, hiperlipidemia e diabetes (NASSER et al., 2011).

5.1.4 Sequestro do radical OH•

Para avaliação da capacidade antioxidante do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* foi utilizada a técnica de sequestro do radical OH•. De acordo com os resultados obtidos, tanto o extrato quanto a fração (Tabela 16) atuaram sobre o sequestro de radicais OH• de forma significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações avaliadas (0,9 a 7,2 µg/mL).

Este método demonstrou ainda que o extrato seco de *T. occidentalis* em baixas concentrações pode ser considerada um potente antioxidante, pois sua CE₅₀ foi de 0,14 µg/mL, sendo esse valor 6 vezes menor do que a concentração inicial da amostra (0,9 µg/mL) e 5 vezes menor que a CE₅₀ do Trolox® (0,76 µg/mL) (Tabela

16). Para a fração polissacarídica, os resultados foram significativamente inferiores ao do Trolox®, reforçando a ideia de que outros compostos com ação antioxidante estão presentes no extrato. Isto porque o modelo de utilização do fitocomplexo é bastante amplo, de modo que o uso terapêutico de uma planta medicinal está comumente associado a diversos componentes e não apenas a um princípio ativo presente na matriz vegetal (OLIVEIRA; AMARAL; CASALI, 1999).

Tabela 16- Potencial antioxidante *in vitro* do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* no sequestro do radical OH•.

Concentrações (µg/mL)	Sequestro do Radical OH• (%) ± dp		
	Extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	Fração polissacarídica	Trolox®
Controle	2,20 ± 0,15	2,20 ± 0,15	2,20 ± 0,15
Sistema	100*	100*	100*
0,9	57,62 ± 0,85 ^a	44,98 ± 3,24 ^{ab}	52,18 ± 0,50 ^a
1,8	59,26 ± 0,10 ^a	50,08 ± 0,03 ^{ab}	59,55 ± 1,31 ^a
3,6	60,36 ± 0,30 ^a	50,35 ± 0,10 ^{ab}	66,16 ± 0,30 ^a
5,4	60,96 ± 0,45 ^{ab}	51,79 ± 0,80 ^{ab}	72,17 ± 0,51 ^a
7,2	66,57 ± 1,36 ^{ab}	57,36 ± 2,50 ^{ab}	73,67 ± 1,04 ^a
CE ₅₀	0,14	1,79	0,76

Os valores representam a média ± desvio padrão (dp) dos valores de inibição *in vitro*, dos experimentos em duplicata (n = 3). *p<0,05 versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^ap<0,05 em relação ao sistema (100% de radicais hidroxila) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). ^bp<0,05 em relação ao Trolox® (0,9-7,2 µg/mL) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Os resultados obtidos, demonstram bastante importância, quando se leva em consideração que o radical OH• é considerado um dos mais potentes oxidantes que podem atravessar as membranas celulares e reagir rapidamente com a maioria das biomacromoléculas, tais como proteínas, lipídios e DNA, podendo causar graves danos a biomoléculas adjacentes e morte celular (BEKTAŞOĞLU et al., 2006; SHEN et al., 2014).

5.1.5 Sequestro do NO

Os compostos capazes de sequestrar o NO podem ser alternativas para a prevenção e terapia de inúmeras patologias (MAIA et al., 2010). Já que, apesar de seu papel endógeno essencial, seu excesso pode estar envolvido na gênese e desenvolvimento de diversas desordens (MAIA et al., 2010; COSTA et al., 2012; SANTANA et al., 2013), tais como retinopatia diabética e esclerose múltipla (MAIA et al., 2010)

A medida da capacidade antioxidante pela eliminação do NO é baseado no princípio de que o NPS numa solução aquosa a pH fisiológico gera espontaneamente o NO, o qual interage com o oxigênio para produzir íons NO_2^- , que por sua vez podem ser detectados por espectrofotometria, após formação de cromóforo pela reação com reagente de Griess (NIKI, 2010). O princípio desta reação foi utilizado nesta avaliação antioxidante e de acordo com os resultados obtidos e expressos na Tabela 17, tanto o extrato seco, como a fração polissacarídica de *T. occidentalis* em todas as concentrações testadas (0,9 a 7,2 $\mu\text{g/mL}$) foram capazes de sequestrar o radical NO e diminuir a formação de NO_2^- a partir de uma solução de NPS.

Foi verificado ainda que o extrato seco demonstrou ser um potente antioxidante, tendo apresentado uma CE_{50} (2,02 $\mu\text{g/mL}$) inferior à do Trolox® (3,23 $\mu\text{g/mL}$), além de ter exibido de forma significativa ($p < 0,05$), um maior percentual de remoção do NO, nas concentrações de 0,9 a 5,4 $\mu\text{g/mL}$, e uma atividade similar na concentração de 7,2 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 17).

Tabela 17- Potencial antioxidante *in vitro* do extrato seco e fração polissacarídica de *T. occidentalis* no sequestro do NO.

Concentrações (µg/mL)	Inibição do NO (%) ± dp		
	Extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	Fração polissacarídica	Trolox®
Controle	2,20 ± 0,15	2,20 ± 0,15	2,20 ± 0,15
NPS	100*	100*	100*
0,9	43,58 ± 0,83 ^{ab}	36,74 ± 2,35 ^a	34,16 ± 0,84 ^a
1,8	48,78 ± 1,39 ^{ab}	44,04 ± 1,42 ^a	39,10 ± 0,49 ^a
3,6	52,59 ± 0,32 ^{ab}	48,35 ± 2,36 ^a	44,77 ± 0,86 ^a
5,4	61,80 ± 2,73 ^{ab}	52,72 ± 1,04 ^a	59,19 ± 0,97 ^a
7,2	65,07 ± 1,50 ^a	55,39 ± 0,38 ^{ab}	66,19 ± 0,28 ^a
CE ₅₀	2,02	4,21	3,23

Os valores representam a média ± desvio padrão (dp) dos valores de inibição *in vitro*, dos experimentos em duplicata (n = 3). *p<0,05 versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^ap<0,05 em relação ao NPS (Nitroprussiato de sódio) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste). ^bp<0,05 em relação ao Trolox® (0,9-7,2 µg/mL) (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Já a fração polissacarídica, nas concentrações de 0,9 a 3,6 µg/mL, apresentou uma atividade similar em relação ao Trolox®, embora tenha exibido uma maior CE₅₀ (4,21 µg/mL) em relação ao padrão (3,23 µg/mL), bem como ao extrato (2,02 µg/mL) (Tabela 17); o que reforça mais uma vez a importância do fitocomplexo e, portanto, do emprego dos extratos vegetais como matéria-prima para produção de fitoterápicos.

Contudo, apesar da dificuldade em se relacionar apenas uma ou algumas substâncias à atividade de drogas vegetais (MARQUES et al., 2013), a investigação e identificação dos principais componentes ativos presentes em plantas medicinais é de extrema importância para produção de fitoterápicos. Pois, além de serem utilizadas como parâmetros de identificação e caracterização da espécie; elas também são empregadas como marcadores farmacológicos na padronização de fitoterápicos. Essa padronização pode ser realizada com base no teor da substância, indicando que se a mesma estiver presente no extrato em quantidade apropriada, os demais componentes também estarão igualmente representados (KLEIN et al.,

2009).

6. Conclusão

6 CONCLUSÃO

A revisão da literatura permitiu concluir que a espécie *T. occidentalis* apresenta amplo potencial a tornar-se um fitoterápico para fortalecimento do sistema imunológico. Pois o seu emprego no aumento da resistência imune encontra-se pautado em uma pluralidade de estudos científicos, sendo essa propriedade atribuída notadamente aos polissacarídeos.

A determinação espectrofotométrica de polissacarídeos totais pelo método de antrona validado neste trabalho apresentou desempenho dentro das especificações sanitárias preconizadas para métodos bioanalíticos, demonstrando ser uma ferramenta viável e adequada para o controle de qualidade da droga vegetal e produtos derivados das partes aéreas de *T. occidentalis*.

A metodologia de superfície resposta foi uma ferramenta efetiva para otimização das condições de extração dos polissacarídeos das partes aéreas de *T. occidentalis*. As condições ótimas de extração foram obtidas empregando-se a proporção de droga vegetal: água de 4 g para 30 mL devido ao maior rendimento relativo obtido e por propiciar uma molhabilidade mais adequada do material vegetal; a temperatura de extração de 95°C, por ter sido o fator mais significativo do processo extrativo; e o tempo de extração de 4,0 h, em virtude do efeito negativo que o tempo exerceu quando aumentado simultaneamente com a temperatura. Os resultados sugerem ainda que o modelo de regressão foi adequado para a extração de polissacarídeos de *T. occidentalis*, podendo ser empregado para estimar o teor de polissacarídeos teórico, sob outras condições experimentais.

O extrato seco obtido por liofilização apresentou, de um modo geral, deficientes propriedades reológicas e características que dificultam sua utilização como IFA no desenvolvimento de fitoterápicos; evidenciando assim a necessidade de intervenção tecnológica para obtenção de uma matéria-prima padronizada a partir da utilização de excipientes que sejam capazes de anular ou mesmo minimizar essas características, tais como o uso de adjuvantes de secagem para diminuir sua elevada higroscopicidade. Além disso, verificou-se ainda a necessidade do controle

de temperatura, até cerca de 120°C, no processamento dessa matéria prima-vegetal; de modo que sua qualidade, eficácia e segurança não sejam comprometidas.

A fração polissacarídica obtida por precipitação etanólica apresentou a mesma composição de monossacarídeos que o extrato seco de *T. occidentalis*, sendo esse um importante ponto de partida para realização de estudos mais aprofundados que permitam a identificação e análise estrutural dos polissacarídeos presentes na espécie.

A partir dos resultados obtidos na avaliação imunoestimulante, verifica-se que o extrato e fração polissacarídica de *T. occidentalis* apresentou efeito frente as citocinas doseadas em BALBs. No entanto, para IL-1 β e IL-6, doseadas em PBMCs, o estímulo provocado pelo contato com as amostras foram altamente significativos. Demonstrando potencial imunoestimulante por parte do extrato e fração polissacarídica de *T. occidentalis*.

Neste estudo foi evidenciado ainda que o extrato seco de *T. occidentalis* apresentou uma relevante atividade antioxidante, através de diferentes métodos, e que esta ação pode, ser justificada, em parte, pelos seus polissacarídeos, embora outros componentes possam ter atuado em sinergia. De modo que para fins da atividade antioxidante, ressaltou-se a importância do emprego do extrato seco como matéria-prima vegetal para produção de fitoterápicos a base de *T. occidentalis*. E que o grupo dos polissacarídeos possa ser utilizado na caracterização, padronização e controle de qualidade desde a droga vegetal até seus produtos intermediários e fitoterápicos.

Diante dos resultados apresentados, e levando em consideração que os agentes antioxidantes e imunoestimulantes, têm se mostrado como uma boa alternativa no fortalecimento do sistema imunológico, novos estudos serão necessários para avaliar a atividade imunoestimulante extrato seco e da fração polissacarídica de *T. occidentalis*, visando verificar não só a estimulação na expressão de citocinas, como também se há potencial inibidor destas.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA-DÍAZ RT, CHABRILLÓN M, CABELLO-PASINI A, LÓPEZ-SOLER B, FIGUEROA FL. Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7. **Ciencias Marinas**, v. 36, n. 4, p. 345–353, 2010.

ABID, S.; KHAJURIA, A.; PARVAIZ, Q.; SIDIQ, T.; BHATIA, A. Immunomodulatory studies of a bioactive fraction from the fruit of *Prunus cerasus* in BALB/c mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 626-634, 2012.

AFACAN, N. J.; FJELL, C. D.; HANCOCK, R. E. A systems biology approach to nutritional immunology - focus on innate immunity. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 14-25, 2012.

AHN, G.; BING, S. J.; KANG, S. M.; LEE, W. W.; LEE, S. H.; MATSUDA, H.; TANAKA, A.; CHO, I. H.; JEON, Y. J.; JEE, Y. The JNK/NFκB pathway is required to activate murine lymphocytes induced by a sulfated polysaccharide from *Ecklonia cava*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Shanghai, v. 1830, n. 3, p. 2820-2829, 2013.

AKHTAR, M.; TARIQ AF.; AWAIS, M.M.; IQBAL, Z.; MUHAMMAD, F.; SHAHID, M.; SAWICKA, E. H. Studies on wheat bran Arabinoxylan for its immunostimulatory and protective effects against avian coccidiosis. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 90, n. 1, p. 333-339, 2012.

ALAMGIR, M. UDDIN, S. J. Recent advances on the ethnomedicinal plants as immunomodulatory agents Ethnomedicine. **Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics**, Kerala, p. 227-244, 2010.

ALLENDE, L. M.; CORELL, A.; MANZANARES, J.; MADRUGA, D.; MARCOS, A.; MADROÑO, A.; LÓPEZ, G. A.; GARCÍA, P. M. A.; MORENO, J. M.; RODRIGO, M.; SANZ, F.; ARNAIZ, V. A. Immunodeficiency associated with anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding Immunology. **Immunology**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 543-551, 1998.

ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ, S. E.; DOMÍNGUEZ, F.; LÓPEZ, T. G.; CHÁVEZ, M.; ORTIZ, T. A. J.; GARCÍA, C. A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 140, p. 438-442,

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

2012.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, G. M. C.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; LEITE, A. C. L.; BRONDANI, D. J.; MEDEIROS, F. P. M.; BIEBER, L. W.; JUNIOR, F. J. B. M. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 413-416, 2008.

ANDRADE, T. C. **Estudo da granulação por solidificação de materiais fundidos em leite fluidizado utilizando dispersão sólida de indometacina**. 2009. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão preto, São Paulo, 2009 121p.

ARANHA, I; CLEMENT, F; VENKATESH, YP. Immunostimulatory properties of the major protein from the stem of the Ayurvedic medicinal herb, guduchi (*Tinospora cordifolia*). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 139, n. 2, p. 366-372, 2012.

ARCHANA.; JATAWA, S.; PAUL, R.; TIWARI, A. Indian medicinal plants: A rich source of natural immuno-modulator. **International Journal of Pharmacology**, Lausanne, v. 7, n. 2, p. 198-205, 2011.

BAGHERI, H.; MANAP, M. Y. B.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. **Talanta**, Oxford, v. 121, p. 220-228, 2014.

BAI, L.; ZHUB, LI-YING; YANG, BAO-SHAN; SHI, LI-JUN; LIUA, Y.; JIANGA, AI-MIN; ZHAOA, LI-LI. Antitumor and immunomodulating activity of a polysaccharide from *Sophora flavescens* Ait. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 51, p. 705-709, 2012.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill (Anacardiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica,

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, São Paulo, 2008, 64p.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, In Vitro and Ex Vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytotherapy Research**, Nova York, v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.

BEKTAŞOĞLU, B.; ESIN CELIK, S.; OZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Ensaio atividade antioxidante Novel de eliminação de radicais hidroxila em antioxidantes solúveis em água utilizando um método CUPRAC modificado. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 345, p. 1194-1200, 2006.

BELLAMY, L. J.; NORDON, A.; LITTLEJOHN, D. Effects of particle size and cohesive properties on mixing studied by non-contact NIR. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 361, n. 1-2, p. 87-91, 2008.

BENMEBAREK, A.; ZERIZER, S.; LAGGOUNE, S.; KABOUCHE, Z. Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noé. **Allergy Asthma & Clinical Immunology**, St Louis, v.9, n. 1, p. 2, 2013.

BEVILACQUA, L. R.; WAITZBERG, D. L.; SOARES, A. D. C.; BEVILACQUA, G. A. A. Efeito imunomodulador de hormônios tímicos sobre o trauma térmico experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, vol. 12, n. 2, p.104-110, 1997.

BHATIA, S.; RATHEE, P.; SHARMA, K.; CHAUGULE, B. B.; KAR, N.; BERA, T. Immuno-modulation effect of sulphated polysaccharide (porphyran) from *Porphyra vietnamensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 57, p. 50-56, 2013.

BIN-HAFEEZ, H. B.; HAQUE, R.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; SAYEED, I.; RAISUDDIN. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 257-265, 2003.

BISWAS, R.; MANDAL, S. K.; DUTTA, S.; BHATTACHARYYA, S. S.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA, B. A. R. Thujone-rich fraction of *Thuja occidentalis* demonstrates major anti-cancer potentials: Evidences from *in vitro* studies on A375 Cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2011, p. 1-16, 2011.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

BODINET, C.; LINDEQUIST, U.; TEUSCHER, E.; FREUDENSTEIN, J. Influence of peroral application of a herbal immunomodulator on the antibody production of Peyer's patches cells. **Arzneimittel-Forschun**, Aulendorf, v. 54, n. 2, p. 114-118, 2004.

BODINET, C.; MENDEL, R.; WEGNER, U.; LINDEQUIST, U.; TEUSCHER, E.; FREUDENSTEIN, J. Effect of oral application of an immunomodulating plant extract on Influenza virus type A infection in mice. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 68, n.10, p.896-900, 2002.

BODINET, C; FREUDENSTEIN, J. Effects of na orally applied aqueous-ethanolic extract of a mixture of *Thuja occidentalis* Herba, *Baptisiae tinctoriae* Radix, *Echinaceae purpureae* Radix and *Echinaceae pallidae* Radix on antibody response against sheep red blood cells in mice. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, n. 8, p. 695-699, 1999.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. de S.; BARBOSA, E. F.; Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia Biosfera**, Goiânia, v. 7, p. 1-20; 2011.

BRASIL, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (DOU de 02/06/2002) - Guia para Validação de métodos analíticos e bioanalíticos - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

BRASIL. Orientações sobre Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2013. Disponível em:<

http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2013.

BYUNG-MAN, K.; LEE, J. E.; JANG-HYUK, A.; TAE-HONG, J. Laser diffraction particle sizing by wet dispersion method for spray-dried infant formula. **Journal of Food Engineering**, Reino Unido, v. 92, p. 324-330, 2008.

CAO, L.; LIU, X.; QIAN, T.; SUN, G.; GUO, Y.; CHANG, F.; ZHOU, S.; SUN, X. Antitumor and immunomodulatory activity of arabinoxylans: A major constituent of wheat bran. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v.48, n.1, p.160–164, 2011.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

CASTELLÓN, M. A.; GARCÍA, D. G.; MÉNDEZ, I. C.; JORGE, M. R.; CRESPO, M. Obtenção e controle de qualidade da tintura-mãe de *Thuja occidentalis*. **Pesquisa homeopática**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 67-75, 2000.

CASTRO, BA. The immunocompromised pediatric patient and surgery. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 611–626, 2008.

CAVALCA, M. **Atividade Imunoestimulante de algumas espécies de *Echinaceae***. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Ciência Biológica e da Saúde. Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2003, 32p.

CECH, N. B.; KANDHI, V.; DAVIS, J. M.; HAMILTON, A.; EADS, D.; LASTER, S. M. *Echinacea* and its alkylamides: Effects on the influenza A-induced secretion of cytokines, chemokines, and PGE2 from RAW 264.7 macrophage-like cells. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 10, n. 10, p.1268-1278, 2010.

CELANO, R. M . G.; NETO, J. E.; BOTTONI, A.; GAGLIARDI, D. Avaliação nutricional pré e pós-operatória dos pacientes com megaesôfago não-avançado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 34, n.3, 2007.

CHAHAR, M. K.; SANJAYA, K. D. S.; LOKESH, T.; MANOHARA, K. P. In-vivo antioxidant and immunomodulatory activity of mesuol isolated from *Mesua ferrea* L. seed oil. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 13, n. 4, p.386-391, 2012.

CHANG, L. C.; SONG, L. L.; PARK, E. J.; LUYENGI, L.; LEE, K. J.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A.D. Bioactive constituents of *Thuja occidentalis*. **Journal of natural products**, Ancara, v. 63, n. 9, p. 1235-1238, 2000.

CHANG, Y. P.; LIU, C. H.; WU, C. C.; CHIANG, C. M.; LIAN, J. L.; HSIEH, S. L. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v.32, n.2, p.284-290, 2012.

CHEN, J. R.; YANG, Z. Q.; HU, T. J.; YAN, Z. T.; NIU, T. X.; WANG, L.; CUI, D. A.; WANG, M. Immunomodulatory activity in vitro and in vivo of polysaccharide from

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

Potentilla anserine. **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 8, p. 1117-1124, 2010.

CHEN, X.; NIE, W.; YU, G.; LI, Y.; HU, Y.; LU, J.; JIN, L. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 695-700, 2012a.

CHEN, Y. An effective method for deproteinization of bioactive polysaccharides extracted from *Lingzhi* (*Ganoderma atrum*). **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 21, n. 1, p. 191-198, 2012b.

CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; NIE, S.; LI, C.; XIE, M. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 156, p. 279-288, 2014.

CHINEN, J; SHEARER, W.T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 125, n. 2, p.195-203, 2008.

CITARASU, T.; BABU, M. M.; SEKAR, R. R. J.; MARIA, M. P. Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius. **Asian Fisheries Science**, Manila, v. 15, p. 21-32, 2002.

CORRÊA, V. S. C.; MAYNIÉ, J. C.; FRANÇA, E. L.; HONÓRIO, F. A. C. Atividade funcional de fagócitos na presença do fitoterápico “Mais Vida”. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 26-32, 2006.

COSTA, D. A.; OLIVEIRA, G. A. L.; SOUZA, D. P.; FREITAS R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 33, n. 4, p. 567-575, 2012.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Campinas, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

CRUZ, F; MELO, V.H. Fatores associados à persistência da infecção pelo HPV na cérvix uterina. **Femina**, São Paulo, v. 38, n. 8, p. 423-427, 2010.

DA COSTA, D. N.; VIANA, P. C. C.; MACIEL, R. P.; GEBRIM, E. M. M. S.; ROCHA, M. S. Sarcoma de Kaposi relacionado à síndrome da imunodeficiência adquirida: características do comprometimento hepático na tomografia computadorizada e na ressonância magnética. **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 139–140, 2008.

DA SILVA, M. N. Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera lagnsdorffii* Desf. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

DE MACÊDO, E. M. C.; AMORIM, M. A. F.; DA SILVA, A. C. S.; DE CASTRO, C. M. M. B. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 329-333, 2010.

DENG, Y.; YANG, G.; YUE, J.; QIAN, B.; LIU, Z.; WANG, D.; ZHONG, Y.; ZHAO, Y. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. **Food Control**, Vurrey, v. 38, p. 184-191, 2014.

DING, X; ZHU, F; GAO, S. Purification, antitumour and immunomodulatory activity of water-extractable and alkali-extractable polysaccharides from *Solanum nigrum* L. **Food Chemistry**, Barking, v. 131, n. 2, p. 677–684, 2012.

DO ROSÁRIO, M. M.; KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DO AMARAL, A. E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. Storage xyloglucans: Potent macrophages activators. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 189, n. 2, p. 127–133, 2011.

DORNAS, P.B; ROBAZZI, T.C.M.V; SILVA, L.R. Imunodeficiência primária: quando investigar, como diagnosticar. **Pediatria**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 51-62, 2010.

DONG, T. T.; CUI, X. M.; SONG, Z. H.; ZHAO, K. J.; JI, Z. N.; LO, C. K.; TSIM, K. W. Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China: Regional and

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

seasonal variations in its active constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 4617-4623, 2003.

DONG, T. T.; ZHAO, K. J.; GAO, Q. T.; JI, Z. N.; ZHU, T. T.; LI, J.; DUAN, R.; CHEUNG, A. W.; TSIM, K. W. Chemical and biological assessment of a chinese herbal decoction containing *Radix Astragali* and *Radix Angelicae Sinensis*: Determination of drug ratio in having optimized properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 2767-2774, 2006.

DU, L.; SHEN, Y.; ZHANG X.; PRINYAWIWATKUL, W.; XU, Z. Antioxidant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidant activity of its extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 153, p. 279–284, 2014.

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Anti diabetic activity of *Thuja occidentalis* Linn. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, Raipur, v. 1, n. 4, p.362-365, 2008a.

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Hepatoprotective activity from ethanol fraction of *Thuja occidentalis* Linn. **Asian Journal of Research in Chemistry**, Raipur, v. 1, n. 1, p.32-35, 2008b.

DUBEY, S. K.; BATRA, A. Role of phenolics in anti-Atherosclerotic property of *Thuja occidentalis* Linn. **Ethnobotanical Leaflets**, Carbondale, v. 13, p. 791-800, 2009a.

DUBEY, S.K.; BATRA, A. Antioxidant activities of *Thuja occidentalis* Linn. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Raipur, v. 2, n. 1, p. 73-76, 2009b.

DUBEY, S.K.; BATRA, A. Role of phenolic compound rich ethanol fraction of *Thuja occidentalis* Linn. in protective mechanism. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 2, p.217-225, 2009c.

EDWARDS, D.R.; DIXON, M.A. Mechanisms of drought response in *Thuja occidentalis* L. I. Water stress conditioning and osmotic adjustment. **Tree Physiology**, Oxford, v. 15, p. 121-127, 1995.

ESBERITOX® N, Quanstar Biotech, 2014. Disponível em: <<http://esberitox.quanstarbiotech.com/philippines/index.cfm?&menuid=5>>. Acesso

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

em: 10 abr. 2014.

FAN, L.; DING, S.; AI, L.; DENG, K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 90, n. 2, p.870-874, 2012.

FAN, Y.; LU, Y.; WANG, D.; LIU, J.; SONG, X.; ZHANG, W.; ZHAO, X.; NGUYEN, T. L.; HU, Y. Effect of epimedium polysaccharide-propolis flavone immunopotentiator on immunosuppression induced by cyclophosphamide in chickens. **Cellular Immunology**, Nova York, v. 281, n. 1, p. 37-43, 2013.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fundação Oswaldo Cruz, 2010. 546 p.

FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. **Thuja occidentalis**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fundação Oswaldo Cruz, 329p, 2011.

FERNANDES, F. H. A.; SANTANA, C. P.; SANTOS, R. L.; CORREIA, L. P.; CONCEIÇÃO, M. M.; MACÊDO, R. O.; MEDEIROS, A. C. D. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 113, n. 2, p. 443-447, 2013.

FERREIRA, M. S. **Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por aspersão de *Psidium guajava* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2009, 74p.

FERREIRA, R. M. **Efeito da adição de antioxidante (Trolox®) ao meio de manutenção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e ao meio de transporte de oócitos bovinos aspirados de ovários provenientes de abatedouro.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, 2008, 138p.

FETROW, C.W.; AVILA, J.R. **Manual de Medicina Alternativa para o profissional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000, 744p.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

FIGUEIRÊDO, C. B. M.; ALVES, L. D. S., SILVA, C. C. A. R., FERREIRA, P. A., MARQUES, G. S.; SANTANA, A. S. C. O., RANDAU, K. P.; PIMENTEL, R. M.M.; SILVA, R. M. F.; ROLIM-NETO, P. J. Physical-chemical characterization, anatomical and seasonal evaluation of *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 5, p. 1721-1731, 2014.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

FRASSON, T.C. **Flavonoides com atividade imunoestimulante**. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Ciências Biológica e da Saúde, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2004, 34p.

FUCK, F. B. S.; LOPES, R. M.; NUNES, S. N.; PACHECO, G. G. L. C.; MARQUES, L. P. J. Prevalência da tuberculose em pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento com hemodiálise crônica. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 147-150, 2004.

GALLO, L.; LLABOT, J. M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract physical properties. **Powder Technology**, Holanda, v. 208, p. 205-214, 2011.

GAUR, K; KORI, M. L; NEMA, R. K. Comparative Screening of Immunomodulatory Activity of Hydro-alcoholic Extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. and Ethanolic Extract of *Cleome gynandra* Linn. **Global Journal of Pharmacology**, Dubai, v. 3, n. 2, p. 85-89, 2009.

GHULE, B. V; YEOLE, P. G. In vitro and in vivo immunomodulatory activities of iridoids fraction from *Barleria prionitis* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 141, n. 1, p. 424-431, 2012.

GOHLA, S. H.; ZEMAN, R. A.; BÖGEL, M.; JURKIEWICZ, E.; SCHRUM, S.; HAUBECK, H. D.; SCHMITZ, H.; HUNSMANN, G.; NETH, R. D. Modification of the In Vitro Replication of the Human Immunodeficiency Virus HIV-1 by TPSg, a Polysaccharide Fraction Isolated from the Cupressaceae *Thuja occidentalis* L. (Arborvitae). **Haematology and Blood Transfusion**, Berlin, v. 35, p. 140-149, 1992.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

GREENBERG, S. B. Infections in the immunocompromised rheumatologic patient. **Critical Care Clinics**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 931-956, 2002.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C.; ARAÚJO, A. A.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

HALHOUL, M. N., KLEINBERG, I. Differential determination of glucose and fructose, and glucose- and fructose-yielding substances with anthrone. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 50, p. 337-343, 1972.

HANSEN, J., MOLLER, I. B. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 68, p. 87-94, 1975.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; JAWAHAR, S.; HEO, M. S. Immunomodulatory effect of *Withania somnifera* supplementation diet in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 32, n. 1, p. 94-100, 2012a.

HARIKRISHNAN, R.; KIM, D. H.; HONG, S. H.; MARIAPPAN, P.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Non-specific immune response and disease resistance induced by *Siegesbeckia glabrescens* against *Vibrio parahaemolyticus* in *Epinephelus bruneus*. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 33, n. 2, p. 359-364, 2012b.

HARIKRISHNAN, R.; KIM, J. S.; KIM, M. C.; DHARANEEDHARAN, S.; KIM, D. H.; HONG, S. H.; SONG, C. Y.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Effect of dietary supplementation with *Suaeda maritima* on blood physiology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Miamiensis avidus*. **Experimental Parasitology**, Nova York, v. 131, n. 2, p.195-203, 2012c.

HARIKRISHNAN, R.; KIM, J. S.; BALASUNDARAM, C.; MOON, S. H. M. S. Protection of *Vibrio harveyi* infection through dietary administration of *Pueraria thunbergiana* in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 324-325, p. 27-32, 2012d.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

HAUKE, W.; KÖHLER, G.; HENNEICKE, V. Z. H. H.; FREUDENSTEIN, J. Esberitox® N as Supportive therapy when providing standard antibiotic treatment in subjects with a severe bacterial infection (acute exacerbation of chronic bronchitis). **Chemotherapy**, Basel, v. 48, n. 5, p. 259–266, 2002.

HEBER, D. **PDR for Herbal Medicines**. 4^a ed, Montvale: PDR Network, 2007, 844p.

HEO, BUK-GU.; PARK, YUN-JUM, PARK, YONG-SEO; BAE, JONG-HYANG.; CHO, JA-YONG.; PARK, KUN.; JASTRZEBSKI, Z.; GORINSTEIN, S. Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 56, p. 9-16, 2014.

ISO (International Organization for Standardization) 13320-1. **Laser Diffraction Methods**. Part 1: General Principles. ISO Standards Authority, Genebra, Suíça, 1999.

JAWAD, M.; SCHOOP, R.; SUTER, A.; KLEIN, P.; ECCLES, R. Safety and Efficacy Profile of *Echinacea purpurea* to Prevent Common Cold Episodes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2012, p.1-7, 2012.

JIANG, B.; ZHANG, H.; LIU, C.; WANG, Y.; FAN, S. Extraction of water-soluble polysaccharide and the antioxidant activity from *Ginkgo biloba* leaves. **Medicinal Chemistry Research**, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 262-270, 2010.

JIN, L.; GUAN, X.; LIU, W.; ZHANG, X.; YAN, W.; YAO, W.; GAO, X. Characterization and antioxidant activity of a polysaccharide extracted from *Sarcandra glabra*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p.524-532, 2012.

JIN, Z.; LIU, Q.; KONG, B. H.; JING, L., CHEN, Q. Antioxidant activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves extracts on pork patties during refrigerated storage. **Advanced Materials Research**, Alemanha, v. 781-784, p. 1500-1507, 2013.

MESQUITA-JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; DE SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; DA SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 552-80, 2010.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

KALEESWARAN, B.; ILAVENIL, S.; RAVIKUMAR, S. Dietary supplementation with *Cynodon dactylon* (L.) enhances innate immunity and disease resistance of Indian major carp, *Catla catla* (Ham.). **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 31, n. 6, p. 953–962, 2011.

KIM, S. B.; CHANG, B. Y.; JO, Y. H.; LEE, S. H.; HAN, S. B.; HWANG, B. Y.; KIM, S. Y.; LEE, M. K. Macrophage activating activity of pyrrole alkaloids from *Morus alba* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 145, n. 1, p. 393–396, 2013.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* v.27, p.485–517, 2009.

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**, Lausanne, v. 146, n. 1, p. 232–242, 2013.

KOVALHULK, L. C. S. Indicações do uso de imunoglobulina intravenosa, 2013. Disponível em:<http://www.imunopediatria.org.br/download/imunoglobulina_intravenosa.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2013.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 3; p. 241-248, 2009.

KRIFA, M.; BOUHLEL, I.; GHEDIRA, C. L.; GHEDIRA, K. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 146, n. 1, p. 243–249, 2013.

KUMAR, S.; RAMAN, R. P.; PANDEY, P. K.; MOHANTY, S.; KUMAR, A.; KUMAR, K. Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 34, n. 2, p. 564-573, 2013.

KUMAR, V. S.; NAVARATNAM, V.; RAJASEKARAN, A.; NAIR, N.; MATHARASI, D. S. P.; NARASIMHAN, S.; RAMACHANDRAN, S. Isolation and characterization of glucosamine from *Azadirachta indica* leaves: An evaluation of immunostimulant

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

activity in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapore, v. 2, n. 3, p. 1561-1567, 2012.

KUSHWAHA, S.; ROY, S.; MAITY, R.; MALLICK, A.; SONI, V. K.; SINGH, P. K.; CHAURASIYA, N. D.; SANGWAN, R. S.; MISRA, B. S.; MANDAL, C.. Chemotypical variations in *Withania somnifera* lead to differentially modulated immune response in BALB/c mice. **Vaccine**, Guildford, v. 30, n. 6, p.1083-1093, 2012.

LAROUCHE, C. **La régénération du *Thuja* après coupes partielles en peuplements mixtes**. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Programa de Pós Graduação em Ciências Florestais, Université Laval, Québec, Canadá, 2009, 158p.

LAROUCHE, C.; RUEL, J.C.; LUSSIER, J.M. Factors affecting northern white-cedar (*Thuja occidentalis*) seedling establishment and early growth in mixedwood stands. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 41, n. 3, p. 568-582, 2011.

LEE, T. T.; TITAN, Y. R.; YU, B. Polysaccharide, Adenosine and Crude Triterpenoid Contents of *Pleurotus Eryngii* and Its Immunostimulant Capacity *in vitro*. **Journal of Agricultural Science and Technology A**, Libertyville, v. 1, p. 1166-1169, 2011.

LENZI, R. M.; CAMPESTRINI, L. H.; OKUMURA, L. M.; BERTOL, G.; KAISER, S.; ORTEGA, G. G.; GOMES, E. M.; BOVO, F.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; STEVANHANCKE, F. R.; MAURER, J. B. B. Effects of aqueous fractions of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. on macrophage modulatory activities. **Food Research International**, Vurrey, v. 53, p. 767-779, 2013.

LEYVA, A.; QUINTANA, A.; SÁNCHEZ, M.; RODRÍGUEZ, E. N.; CREMATA, J.; SÁNCHEZ, J. C. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation. **Biologicals**, Londres, v. 36, n. 2, p. 134-41, 2008.

LIMA, B.N.N. Estudo do Amido de Farinhas Comerciais Comestíveis. **Polímeros**, São Carlos v. 22, n. 5, p. 486-490, 2012.

LIMA, E. S.; ANDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVÊA, C. M. C. P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.

LIU, T.; YE, L.; GUAN, X.; LIANG, X.; LI, C.; SUN, Q.; LIU, Y.; CHEN, S.; BANG, F.; LIU, B. Immunopotentiating and antitumor activities of a polysaccharide from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 54, p. 225–229, 2013.

LIU, X. L.; XI, Q. Y.; YANG, L.; LI, H. Y.; JIANG, Q. Y.; SHU, G.; WANG, S. B.; GAO, P.; ZHU, X. T.; ZHANG, Y. L. The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 30, n. 2, p.495-500, 2011.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LUO, D. Optimization of total polysaccharide extraction from *Dioscorea nipponica* Makino using response surface methodology and uniform design. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 90, n. 1, p.284-288, 2012.

MA, L.; GAN, D.; WANG, M.; ZHANG, Z.; JIANG, C.; ZENG X. Optimization of extraction, preliminar characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 87, n. 2, p. 1390-1398, 2012.

MAIA, R. M.; MOURA, C. W. N.; BISPO, V. S.; SANTOS, J. L. A.; SANTANA, R. S.; MATOS, H. R. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo v. 20, n. 4, p. 489-493, 2010.

MARQUES, C. D. L.; DANTAS, A. T.; FRAGOSO, T. S.; DUARTE, A. L. B. P. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 1, p 67-80, 2010.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; NETO, P. J. R.; Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2012.

MARQUES, G. S. **Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonoides totais e canferitrina em folhas de *Bauhinia forficata* Link**. Dissertação (Mestrado acadêmico em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2011, 128p.

MARQUES, G. S.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; ROLIM, L. A.; XAVIER, H. S.; ROLIM-NETO, PEDRO J.; SOARES, L. A. L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 51-57, 2013.

MARQUES, G. S.; SILVA, C. C. A. R.; VILELA, W. T.; SILVA, C. A. A.; MEDEIROS, G. C. R.; SILVA, R. M. F.; ROLIM-NETO, P. J. Optimization and validation of a method for the quantification of polysaccharides of *Thuja occidentalis* LINN. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Panchkula, v. 5, n. 8, p. 3183-3194, 2014.

MARTENS, D. A.; FRANKENBERGER, J. W. T. Soil saccharide extraction and detection. **Plant and Soil**, The Hague, v. 149, n. 1, p. 145-147, 1993.

MASSAMBAMI, E. M.; BAZOTTE, R. B. Importância da Glutamina na Terapia Nutricional. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, São José do Rio Preto, v. 2, n. 3, p.295-298,1998.

MATTOS, T. C. G. **Mecanismos da ação antioxidante dos ácidos cafeico e tânico em sistemas contendo íons ferro**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2009, 206p.

MAURYA, A.; KHAN, F.; BAWANKULE, D. U.; YADAV, D. K.; SRIVASTAVA, S. K. QSAR, docking and in vivo studies for immunomodulatory activity of isolated triterpenoids from *Eucalyptus tereticornis* and *Gentiana kurroo*. **European Journal**

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

of **Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 152–161, 2012.

MEDINA-BELTRÁN, V.; LUNA, G. A.; FIERRO, C. J. A.; CAMPA, C. A. I.; PERAZA, G. V.; FLORES, M. M. D. C.; RIVERA, J. N. G. *Echinacea purpurea* and *Uncaria tomentosa* reduce the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 358–359, p. 164-169, 2012.

MORAIS, M. L.; SILVA, A. C. R.; ARAÚJO, C. R. R.; ESTEVES, E. A.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. Determinação do potencial antioxidante *in vitro* de frutos do cerrado brasileiro. **Revista brasileira de fruticultura**, Cruz das Almas, v. 35, n. 2, p. 355-360, 2013.

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 16, n. 2, p. 79-88, 2006.

MUELLER, B. U; PIZZO, P. A. Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 126, n. 1, p. 1-10, jan.1995.

MUSA, K.H.; ABDULLAH, A.; KUSWANDI, B.; HIDAYAT, M.A. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, n. 4, p. 4102-4106, 2013.

NASCIMENTO, J. E.; LACERDA, E. U.; NASCIMENTO, V. T.; MELO, J. G.; ALVES, B. DE S.; SILVA, L. G. DE M.; RAMOS, M. A.; LIMA, C. S. DE A.; DE ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. AMORIM. Produtos à base de Plantas Medicinais comercializados em Pernambuco - Nordeste do Brasil. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, La Plata, v. 24, n. 1, p. 113-22, 2005.

NASCIMENTO, A. M. **Polissacarídeos e metabólitos secundários de *Spilanthes oleracea* L. (Jambu)**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2012, 100p.

NASER, B.; BODINET, C.; TEGTMEIER, M.; LINDEQUIST, U. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A Review of its Pharmaceutical, Pharmacological and Clinical Properties. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, v.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

2, n. 1, p. 69-78, 2005a.

NASER, B.; LUND, B.; HENNEICKE, V. Z. H. H.; KÖHLER, G.; LEHMACHER, W.; SCAGLIONE, F. A randomised double-blind placebo-controlled clinical dose-response trial of an extract of Baptisia/Echinacea and *Thuja* in the treatment of patients with common cold. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 12, n. 10, p. 715-722, 2005b.

NASSER, A. L. M.; DOURADO, G. K.; MANJATE, D. A.; CARLOS, I. Z.; CESAR, T. B. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, n. 2, p. 275-279, 2011.

NETO, J. M. F. A.; MACEDO, D. V. O método de detecção de limiar de estresse oxidativo aplicada em jogadores profissionais de futebol. **EFDeportes**, Buenos Aires, n. 159, 2011. Não paginado.

NETO, J. M. F. A.; DONADON, C. C.; RIVERA, R. J. B.; CALVI, R.G. Correlação entre peroxidação lipídica e níveis de creatina quinase plasmática em jogadores de tênis de campo juvenis durante um período competitivo. **Brazilian Journal of Biomotricity**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p. 01-10, 2012.

NEVES-JORGE J. P.; DIAS JÚNIOR, A. R.; BEZERRA, C. A.; GUERRA, D. M. M.; ALVES, F. E.; GUIDI, H. G. C.; FOCCI, J.; SAMPAIO, L. C. S.; CARDIAL, M. F. T.; CAVALCANTI, M. L. P. SANTOS, M. Q. C.; SIQUEIRA, M. P.; OYAKAWA, N.; HARFUSH, V. L. G.; FERREIRA, W. T. **Tratamento – abordagem no homem e na mulher**. In: Carvalho J. J. M. I Consenso Brasileiro de HPV, São Paulo: BG Cultural, 1ª ed, p. 111-128, 2000.

NGUYEN, T. L.; CHEN, J.; HU, Y.; WANG, D.; FAN, Y.; WANG, J.; ABULA, S.; ZHANG, J.; QIN, T.; CHEN, X.; CHEN, X.; KHAKAME, S. K.; DANG, B. K. In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 90, n. 3, p. 1254-1258, 2012.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova York, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

NIKOLIĆ, B.; MITIĆ, Ć. D.; VUKOVIĆ, G. B.; KNEŽEVIĆ, V. J. Modulation of

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, Zurich, v. 49, n. 9, p. 2035-2045, 2011.

NWORU, C.; ESIMONE, C.; TEMCHURA, V.; TOUKAM, D. K.; TENBUSCH, M.; ÜBERLA, K. Adjuvant potentials of AcF1, an immunostimulant fraction of *Alchornea cordifolia* extract. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 39, n. 2, p. 132-158, 2010.

ÖKZAN, B.; HATUN, S.; BEREKET, A. Vitamin D intoxication. **The Turkish Journal of Pediatrics**, Ankara, v. 54, p. 93-98, 2012.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Brazilian journal of anesthesiology**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, J. E. Z.; AMARAL, C. L. F.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Brasília-DF: Editora da Embrapa - Sede DF, 1999. 24p.

ONG, M.Y.; YUSOF, Y.A.; AZIZ, M.G.; CHIN, N.L.; MOHD. AMIN, N. A. Characterisation of fast dispersible fruit tablets made from green and ripe mango fruit powders. **Journal of Food Engineering**, Reino Unido, v. 125, p. 17-23, 2014.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PEREIRA, S. Efeito da Desnutrição na Resposta Imune ao Stress. **Nutricias**, Porto, p.18-21, 2007.

PETROVICK, G. F.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Achyrocline satureioides (Lam.) DC., Asteraceae: development of granules from spray dried powder. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, p. 803-811, 2010.

PLUDOWSKI, P.; HOLICK, M. F.; PILZ, S.; WAGNER, C. L.; HOLLIS, B. W.; [GRANT](#).

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

[W. B.](#); SHOENFELD, Y.; LERCHBAUM, E.; LLEWELLYN, D. J.; KIENREICH, K.; SONI, M. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality- a review of recent evidence. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 10, p. 976-989, 2013.

PONTON, F.; WILSON, K.; HOLMES, A. J.; COTTER, S. C.; RAUBENHEIMER, D.; SIMPSON, S. J. Integrating nutrition and immunology: A new frontier. **Journal of Insect Physiology**, Londres, v. 59, n. 2, p. 130-137, 2013.

RAM, G; CHINEN, J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 164, n. 1, p.9-16, 2011.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9–10, p. 1231-1237, 1999.

REITZ, H. D.; HERGARTEN, H. Immunmodulatoren mit pflanzlichen Wirkstoffen-2. Teil: eine wissenschaftliche Studie am Beispiel Esberitoxs N. **Notabene Medici**, Melsungen, v. 20, p. 304-306/362–366, 1990.

REN, L.; PERERA, C.; HEMAR, Y.; Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. **Food & function**, Cambridge v. 3, p. 1118-1130, 2012.

ROE, J. H., DAILEY, R. E. Determination of glycogen with the anthrone reagent. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 15, p. 245-250, 1966.

SANTANA, L. C. L. R.; SILVA, O. A.; BRITO, M. R. M.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GALVÃO, K. C. S.; MORAES, J.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e antihelmíntica do extrato etanólico padronizado das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista brasileira de farmácia**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 120-129, 2013.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

SANTANA, M. F. S.; KATEKAWA, M. E.; TANNOUS, K.; LIMA, A. K. V. O. GASPARETTO, C. A. Área superficial e porosidade da fibra alimentar do albedo de laranja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 14, n. 3, p. 261-273, 2012.

SANTOS, F. L. A. **Caracterização Físico-Química do Extrato Seco de *Baccharis trimera* (LESS.) DC. e do antirreumático sulfato de hidroxocloroquina como etapa de um estudo de pré-formulação.** 2013. Qualificação (Doutorado acadêmico em Ciência Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2013.

SANTOS, M. S.; PETKOWICZ, C. L. O.; HAMINIUK, C. W. I.; CANDIDO, L. M. B. Polissacarídeos Extraídos da Gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): Propriedades Químicas e Perfil Reológico. **Polímeros**, São Carlos, v. 20, n. especial, p. 352-358, 2010.

SANTOS, P. B. dos. **Efeito imunomodulatório do resveratrol em células do sistema imune in vitro e na administração via oral de ovalbumina em camundongos.** 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2010.

SARRAGUÇA, M. C.; CRUZ, A. V.; SOARES, S. O.; AMARAL, H. R.; COSTA, P. C.; LOPES, J. A. Determination of flow properties of pharmaceutical powders by near infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Londres, v. 52, p. 484-492, 2010.

SCHULDT, E. Z. **Estudo de uma fração rica em compostos fenólicos provenientes de uvas da variedade bordô (*Vitis labrusca* L.), sobre o sistema cardiovascular: enfoque na aterosclerose experimental.** 2005. p.103. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2005.

SCOPARO, C. T.; SOUZA, L. M.; RATTMANN, Y. D.; DARTORA, N.; PAIVA, S. M. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides from green and black teas and their protective effect against murine sepsis. **Food Research International**, Vurrey, v. 53, p. 780-785, 2013.

SCOTT, T. A., MELVIN, E. H. Determination of dextran with anthrone. **Analytical**

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

Chemistry, Washington, v. 25, p. 1656-1661, 1953.

SEKHON, B. K.; SZE, D. M.; CHAN, W. K.; FAN, K.; LI, G. Q.; MOORE, D. E.; ROUBIN, R. H. PSP activates monocytes in resting human peripheral blood mononuclear cells: Immunomodulatory implications for cancer treatment. **Food Chemistry**, Barking, v.138, n.4, p.2201–2209, jun.2013.

SEPHTON, S. E.; DHABHAR, F. S.; KEUROGHLIAN, A. S.; GIESE-DAVIS, J.; MCEWEN, B.S.; IONAN, A. C.; SPIEGEL, D. Depression, cortisol, and suppressed cell-mediated immunity in metastatic breast cancer. **Brain, Behavior and Immunity**, San Diego, v. 23, n. 8, p. 1148-55, nov.2009.

SHARMA, U.; BALA, M.; KUMAR, N.; SINGH, B.; MUNSHI, R. K.; BHALERAU, S. Immunomodulatory active compounds from *Tinospora cordifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 141, n. 3, p. 918-926, 2012.

SHEN, S.; CHEN, D.; LI, X.; LI, T.; YUAN, M.; ZHOU, Y.; DING, C. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla*. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 104, p. 80-86, 2014.

SILVA, A. A. **Otimização do pré-tratamento ácido de torta de caroço de algodão e bagaço de malte com farinha de pupunha para produção de bioetanol de segunda geração**. 2012. 99p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 2012.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; PANEK, A. D.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; RENNO, M. N.; FALCÃO, D. Q.; CERQUEIRA, D. M.; MINTO, A. B.; NOGUEIRA, F. L.; QUARESMA, C. H.; SILVA, J. F.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, Londres, v. 52, n. 3, p. 229-233, 2005.

SILVA, R. M. F. **Peperomia pelúcida L. (H.b.k.): obtenção tecnológica de formas farmacêuticas**. 2010. 186p. Tese (Doutorado acadêmico em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2010.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

SIQUEIRA, E. S. Imunoglobulinas. Indicações e Efeitos Colaterais, 2012. In: Residência médica. Disponível em: <www.paulomargotto.com.br/documentos/Imunoglobulinas.ppt>. Acesso em: 16 abr. 2014.

SMIDERLE, F. R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M. Z.; IACOMINI, M.; WICHES, H. J.; VAN, G. L. J. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)-d-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v.94, n.1, p.91– 99, 2013.

SONG, S. H.; MIN, H. Y.; HAN, A. R.; NAM, J. W.; SEO, E. K.; SEOUNG, W. P.; SANG, H. L.; SANG, K. L. Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the regulation of NF- κ B activity. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p.298-302, 2009.

SONG, X.; LI, C. Y.; ZENG, Y.; WU, H. Q.; HUANG, Z.; ZHANG, J.; HONG, R. S.; CHEN, X.X.; WANG, L. Y.; HU, X. P.; SU, W. W.; LI, Y.; HE, Z. D. Immunomodulatory effects of crude phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 144, n. 3, p. 584–591, 2012.

SOUZA, P. C. de. **Modelo experimental de imunossupressão com ciclofosfamida em *Rattus norvegicus* da linhagem wistar e primatas não humanos da espécie *Cebus apella*: análise genotóxica**. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, Pará, 2011, 77 p.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SPANIOL, B. **Comparação do comportamento compressional de granulado contendo produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. entre máquinas de comprimir alternativa e rotativa**. Dissertação (Mestrado acadêmico em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

Grande do Sul, 2007, 186p.

SRINIVASA, B. T.; ALIZADEHFAR, R.; DESROSIERS, M.; SHUSTER, J.; PAI, N. P.; TSOUKAS, C. M. Adult Primary Immune Deficiency: What Are We Missing? **The American Journal of Medicine**, Nova York, v. 125, n. 8, p. 779-786, 2012.

STANGERLIN, D. M.; DE MELO, R. R.; ROPPA, C.; LILGE, D. S. Sistemas de cultivo e custos de produção de *Thuja occidentalis* L. e *Thuja orientalis* L. em quatro municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Journal of Brazilian Society of Urban Forest**, Piracicaba, v. 3, n. 2, p. 98-109, 2008.

SUÁREZ, E. R.; BUGDEN, S. M.; KAI, F. B.; KRALOVEC, J. A.; NOSEDA, M. D.; BARROW, C. J.; GRINDLEY, T. B. First isolation and structural determination of cyclic b-(1-2)-glucans from an alga, *Chlorella pyrenoidosa*, *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 343, p. 2623-2633, 2008.

SUÁREZ, E. R.; KRALOVEC, J. A.; GRINDLEY, T. B. Isolation of phosphorylated polysaccharides from algae: the immunostimulatory principle of *Chlorella pyrenoidosa*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 345, n. 9, p. 1190-1204, 2010.

SUCHKOV, S. V.; PETRUNIN, D. D.; KOSTALEVSKAYA, A. V.; KACHKOV, I. A.; ELBEIK, T.; MATSUURA, E.; PALTSEV, M. A. Cancer-associated immune-mediated syndromes: Pathogenic values and clinical implementation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Nova York, v. 61, n. 6, p. 323-37, 2007.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUN, H. X.; WANG, H.; XU, H. S.; NI, Y. Novel polysaccharide adjuvant from the roots of *Actinidia eriantha* with dual Th1 and Th2 potentiating activity. **Vaccine**, Guildford, v. 27, n. 30, p. 3984-3991, 2009.

SUN, J.; YIN, G.; DU, P.; CHEN, L. Optimization of extraction technique of polysaccharides from pumpkin by response surface method. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 11, p. 2218-2222, 2011.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

SUNILA, E. S.; HAMSA, T. P.; KUTTAN, G. Effect of *Thuja occidentalis* and its polysaccharide on cell-mediated immune responses and cytokine levels of metastatic tumor-bearing animals. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 49, n. 10, p. 1065–1073, 2011.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. A preliminary study on antimetastatic activity of *Thuja occidentalis* L. in mice model. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, Londres, v. 28, n. 2, p. 269-280, 2006.

SVAJDLENKA, E.; MÁRTONFI, P.; TOMASKO, I.; GRANCAI, D.; NAGY, M. Essential oil composition of *Thuja occidentalis* L. samples from Slovakia. **Journal of Essential Oil Research**, Estados Unidos, v. 11, p. 532-536, 1999.

TALPUR, A. D.; IKHWANUDDIN, M. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 364-365, p. 6–12, 2012.

TALPUR, A. D.; IKHWANUDDIN, M.; BOLONG, A. B .A. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 400, p. 46-52, 2013.

TALPUR, A. D; IKHWANUDDIN, M. *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 34, n. 1, p. 254-264, 2013.

TANG, X. H.; YAN, L. F.; GAO, J.; YANG, X. L.; XU, Y. X.; GE, H. Y.; YANG, H. D. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 51, n. 5, p. 1134–1139, 2012.

TAN, S.; XU, Q.; LUO, Z.; LIU, Z.; YANG, H.; YANG, L. Inquiry of Water-Soluble Polysaccharide Extraction Conditions from Grapefruit Skin. **Engineering**, v. 3, p. 1090-1094, 2011.

TANG, Z.; GUO, S.; RAO, L.; QIN, J.; XU, X.; LIAN, Y. Optimization of the technology

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

of extracting water-soluble polysaccharides from *Morus alba* L. leaves. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 59, p. 12684-12690, 2011.

TEUSCHER, E.; BODINET, C.; LINDEQUIST, U.; FREUDENSTEIN, J. Untersuchungen zu Wirksubstanzen pflanzlicher Immunstimulanzen und ihrer Wirkungsweise bei peroraler Applikation. **Zeitschrift für Phytotherapie**, Stuttgart, v. 25, p. 11–20, 2004.

TIAN, S.; ZHOU, X.; GONG, H.; MA, X.; ZHANG, F. Orthogonal test design for optimization of the extraction of polysaccharide from *Paeonia sinjiangensis* K.Y. Pan. **Pharmacognosy Magazine**, Bangalore, v. 7, n. 75, p. 4-8, 2011.

TOENNIES, G., KOLB, J. J. Carbohydrate analysis of bacterial substances by a new anthrone procedure. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 8, p. 54-69, 1964.

TSIRI, D.; GRAIKOU, K.; POBLOCKA O. L.; KRAUZE, B. M.; SPYROPOULOS, C.; CHINOI, I. Chemosystematic value of the essential oil composition of Thuja species cultivated in Poland-antimicrobial activity. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 11, p. 4707-4715, 2009.

TUYEN, C. K.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidante properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, Londres, v. 98, p. 385–392, 2010.

VALSA, J. O.; FELZENSZWALB, I. Genotoxic evaluation of the effect of *Thuja occidentalis* tinctures. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 61, n. 2, p. 329-332, 2001.

VERMA, V. K.; RANI K. V.; SEHGAL, N.; PRAKASH, O. Immunostimulatory response induced by supplementation of *Ficus benghalensis* root powder, in the artificial feed the Indian freshwater murrel, *Channa punctatus*. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 33, p. 590-596, 2012.

VIEIRA, A. C. Q. M.; MARQUES, G. S.; MELO, C. M.; SILVA, K. E. R.; ROLIM, L. A.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; ROLIM-NETO, P. J. Physical–chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients. **Journal of thermal analysis**

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

and calorimetry, Dordrecht, v.115, n.3, p. 2339-2349, 2013.

WANG, J. M.; JI, L. L.; BRANFORD, W. C. J.; WANG, Z. Y.; SHEN, K. K.; LIU, H.; WANG, Z. T. Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in vivo. **Fitoterapia**, Milano, v. 83, n. 2, p. 388-394, 2012.

WANG, J.; WANG, Y.; LIU, X.; YUAN, Y.; YUE, T. Free radical scavenging and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides derivatives. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 91, n. 1, p. 33-38, 2013.

WELLS, J. I. **Pharmaceutical preformulation – the physicochemical properties of drug substances**. Nova York: Ed. Ellis Horwood Limited, 2010, 227p.

WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 88, n. 1, p. 13-20, 2012.

WU, Y. R. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 34, n. 1, p. 220-227, 2013.

WU, C. H.; MURTHY, H. N.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Enhanced production of caftaric acid, chlorogenic acid and cichoric acid in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by the manipulation of incubation temperature and photoperiod. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 301–303, 2007.

XIA, L.; LIU, X.; GUO, H.; ZHANG, H.; ZHU, J.; REN, F. Partial characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from the stem of *Dendrobium officinale* (*Tiepishihu*) *in vitro*. **Journal of functional foods**, Londres, v. 4, n. 1, p.294-301, 2012.

XU, C.; LIU, Y.; YUAN, G.; GUAN, M. The contribution of side chains to antitumor activity of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 50, n. 4, p. 891-894, 2012.

XU, H. S.; WU, Y. W.; XU, S. F.; SUN, H. X.; CHEN, F. Y.; YAO, L. Antitumor and

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

immunomodulatory activity of polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 125, n. 2, p. 310-317, 2009a.

XU, H.; YAO, L.; SUN, H.; WU, Y. Chemical composition and antitumor activity of different polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 78, p. 316-322, 2009b.

YE, C. L.; JIANG, C. J. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 84, n. 1, p. 495-502, 2011.

YEE, J.; CHRISTOU, N. V. Perioperative Care of the Immunocompromised Patient. **World Journal of Surgery**, Nova York, v. 17, n. 2, p. 207-214, 1993.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, Londres, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

YI, Y.; ZHANG, M. W.; LIAO, S. T.; ZHANG, R. F.; DENG, Y. Y.; WEI, Z. C.; TANG, X. J.; ZHANG, Y. Structural features and immunomodulatory activities of polysaccharides of longan pulp. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 87, n. 1, p. 636-643, 2012.

YOGEEESWARAN, A. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by inactivated vaccine with herbal immunostimulants. **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 32, n. 6, p. 1058-1067, 2012.

YUAN, C.; PAN, X.; GONG, Y.; XIA, A.; WU, G.; TANG, J.; HAN, X. Effects of Astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 51-58, 2008.

ZHU, C.; LIU, X. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Pomegranate peel by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, Londres, v. 92, n. 2, p. 1197-1202, 2013.

SILVA, C. C. A. R. Obtenção e avaliação farmacológica de extrato seco padronizado à base da espécie vegetal *Thuja occidentalis* LINN., 2015

Apêndice

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral e imunoestimulante de extratos de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MAIORES DE 18 ANOS – Resolução 466/12

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa: “Avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral e imunoestimulante de extratos de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Graziella Silvestre Marques, com endereço no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N – Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife – PE, telefone: 9769-0173 e e-mail: grazismarques@yahoo.com.br e está sob a orientação de: Dr. Pedro José Rolim Neto, Telefones para contato: (3272-1383), e-mail (rolim.pedro@gmail.com). Também participam também desta pesquisa: Lariza Darlene Santos Alves, telefone: (3272-1383) e Caio César de A. R. Silva, telefone: (8208-7287). Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa tem por objetivo determinar as propriedades antitumoral (combate ao câncer) e imunoestimulante (melhoria da imunidade) da Tuia (planta medicinal), possibilitando uma possível alternativa terapêutica a base de uma planta medicinal.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo para a disponibilização do sangue que viabilizará as células do sangue que serão utilizadas. Este estudo inclui a participação de 15 indivíduos.

Riscos: Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta é

feita no braço e a quantidade coletada é de 12 mL. A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar aparecimento de hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

Benefícios: Não estão previstos benefícios diretos, entretanto, como benefícios indiretos, os resultados serão importantes para um melhor entendimento da atividade antitumoral e imunoestimulante relacionada a *Thuja occidentalis*. Nesse contexto contribuirá para o desenvolvimento de fitoterápicos a base dessa planta medicinal, levando em consideração os aspectos de eficácia e segurança que serão inicialmente investigados através das análises a serem realizadas nesse estudo.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço acima informado, pelo período de no mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____,
CPF: _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral e imunoestimulante de extratos de *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)”, como voluntário (a). Fui diretamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data: _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: