República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014029204-7 A2

(22) Data do Depósito: 24/11/2014

(43) Data da Publicação: 31/05/2016

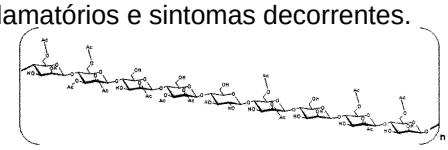
(54) Título: DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO DE ALOE COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E PROCESSO PARA OBTENÇÃO DO MESMO

(51) Int. Cl.: C12P 19/04; A61K 31/715; A61P 29/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE GRANDE DOURADOS

(72) Inventor(es): MIGUEL DANIEL NOSEDA, LUCIANO HENRIQUE CAMPESTRINI, JENIFER MOTA RODRIGUES, MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA, CANDIDA APARECIDA LEITE KASSUYA

(57) Resumo: RESUMO DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO DE ALOE COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E PROCESSO PARA OBTENÇÃO DO MESMO A presente invenção trata de um despolimerizado enzimático de Aloe como agente anti-inflamatório e processo para obtenção do mesmo. A invenção relata o uso de um polissacarídeo de baixa massa molar, obtido a partir de despolimerização enzimática da fração polissacarídica de Aloe barbadensis Miller como agente anti-inflamatório, utilizado de forma isolada ou em conjunto de outros ativos, em composições farmacêuticas ou dermocosméticas. Especificamente trata dos processos de produção deste polímero ativo e seu uso em métodos e composições para tratamento de doenças inflamatórias, processos inflamatórios e sintomas decorrentes.



DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO DE ALOE COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E PROCESSO PARA OBTENÇÃO DO MESMO

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção refere-se ao uso e obtenção de um despolimerizado enzimático a partir da fração polissacarídica de *Aloe barbadensis* Miller e sua aplicação como agente anti-inflamatório. Mais precisamente, a técnica caracteriza-se por um processo de extração e obtenção de um produto a partir de despolimerização enzimática, seguida de isolamento para obtenção da massa, pó ou frações, para emprego ou comercialização total ou parcial com finalidades de aplicação nas áreas da química, farmacologia, dermatologia, cosmetologia, medicinal ou terapêutica. Mais especificamente trata da obtenção de um despolimerizado enzimático a partir da fração polissacarídica de *Aloe barbadensis* Miller, o qual pode ser empregado para o tratamento de condições inflamatórias.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

Aloe barbadensis Miller e seu potencial terapêutico

[002]. *Aloe barbadensis* Miller, popularmente conhecida como babosa ou Aloe é uma das espécies que apresenta grande interesse terapêutico (ARAÚJO, P. S. *et al.* Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - Liliaceae). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 54-57, 1999). As Aloes são utilizadas na medicina popular, devido aos seus efeitos benéficos principalmente para o tratamento de problemas de pele e no controle de infecções e inflamações (VISUTHIKOSOL, V. *et al.* Effect of *Aloe vera* gel to healing of burn wound a clinical and histological study. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 78, p. 403-

409, 1995; OKAMURA, N. *et al.* Three chromone components from *Aloe vera* leaves. **Phytochemistry**, v. 43, p. 495-498, 1996; VAZQUEZ, B. *et al.* Antiinflamatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 69-75, 1996; RODRIGUEZ, J. D. *et al.* Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 81-87, 2005). O extrato aquoso obtido de suas folhas é o principal produto utilizado, e é constituído, majoritariamente, de polissacarídeos, além de outros compostos (YUSUF, S.; AGUNU, A.; DIANA, M. The effect of *Aloe vera* A. Berger (Liliaceae) on gastric secretion and acute gastric mucosal injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 33-37, 2004).

[003]. Estudos demonstram que polissacarídeos exibem um grande número de propriedades terapêuticas, incluindo a modulação do sistema imune inato, mais especificamente da função de macrófagos, além de outras atividades como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária (SHEETS, M. A. *et al.* Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. **Molecular biotherapy**, v. 3, p. 41-45, 1991; VAZQUEZ, B. *et al.* Antiinflamatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 69-75, 1996; STUART, R. W. *et al.* Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant acemannan. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, p. 75-82, 1997; YUN, C. H. *et al.* β-(1→3, 1→4) oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. **International Journal of Parasitology**, v. 27, p. 329-337, 1997; HRCKOVA, G.; VELEBNY, S. Treatment of *Toxocara canis* infections in

mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. **Journal of Helminthology**, v. 75, p. 141-146, 2001; SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317-333, 2006). Para *Aloe barbadensis* Miller, tanto o extrato aquoso, como a fração polissacarídica obtida por precipitação etanólica, apresentam atividade cicatrizante, antiangiogênica, antiulcerativa, antineoplásica e antiviral (KIM, H. S.; KACEW, S.; LEE, B. M. *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1637-1640, 1999; PAEZ, A. *et al.* Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 133-139, 2000; CAMPESTRINI, L. ***Aloe barbadensis* Miller: análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana**. 203p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007). Nos estudos utilizando o extrato aquoso, sugere-se que as atividades biológicas possam ser atribuídas pela interação sinergística de seus constituintes (FEMENIA, A. *et al.* Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999).

Polissacarídeos do parênquima de reserva de *Aloe barbadensis* Miller

[004]. Dos polissacarídeos encontrados no parênquima de reserva de *A. barbadensis*, destacam-se as glucomananas, que são polímeros formados por D-glucose e D-manose. Polímeros de D-manose (mananas) isoladas ou em combinação com outras unidades monossacarídicas são um constituinte comum de polissacarídeos de plantas (ASPINAL, G. O. Mannans, galactomannans and glucomannans. In: ASPINAL, G. O. *et al.* **Polysaccharides**. New York: Pergamon Press Limited, p. 85-93, 1970).

[005]. Um dos primeiros trabalhos voltado à determinação de estruturas de polissacarídeos isolados do gênero *Aloe* foi publicado em 1948 e descreveu a composição do extrato de *A. barbadensis* (EA). Utilizando hidrólise ácida total da fração polissacarídica, foram identificadas massas equimolares de manose e glucose e 2,73% em peso seco de ácidos urônicos (ROBOZ, E.; HAAGEN-SMITH, M. A mucilage from *Aloe vera*. **Journal American Chemical Society**, v. 70, p. 3248, 1948). Na década de 1960, outro estudo com uma fração parcialmente purificada do EA, identificou além de manose e glucose, traços de arabinose, galactose e xilose (SEGAL, A.; TAYLOR, J. A.; EOFF, J. C. A re-investigation of the polysaccharide material from *Aloe vera* mucilage. **Lloydia**, v. 41, p. 423, 1968). Em 1978, Waller, Mangiafico e Ritchey isolaram também um polissacarídeo obtido do EA, cuja composição foi manose e glucose (WALLER, G. R.; MANGIAFICO, S.; RITCHEY, C. R.; A chemical investigation of *Aloe barbadensis* Miller. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 58, p. 69-76, 1978).

[006]. Gowda, Neelisiddaiah e Anjaneyalu (1979) isolaram quatro polissacarídeos do EA através de precipitações seletivas com etanol, nomeados de A1A, A1B, A2 e B, que foram identificados como glucomananas parcialmente acetiladas, com diferentes proporções entre as unidades de glucose, manose e grupamentos acetila. O trabalho demonstrou que o polissacarídeo B possuía maior conteúdo de *O*-acetil e que com tratamento alcalino, este perdia a propriedade de formar gel. Este foi o primeiro trabalho a relatar a presença de grupamento acetila nesta espécie. A metilação dessas glucomananas mostrou uma estrutural linear com ligações β-(1→4) (GOWDA, D. C.; NEELISIDDAIAH, B.; ANJANEYALU, Y. V. Structural studies of polysaccharides from *Aloe vera*. **Carbohydrate Research**. v. 83, p. 402-405, 1979).

[007]. Posteriormente, Mandal e Das (1980) determinaram a estrutura de uma β-D-galactana ramificada em O-6, extraída com água a 100°C, do tecido parenquimático da folha de Aloe. Esta foi fracionada em coluna de DEAE-celulose, de onde foi obtido um polissacarídeo contendo 92,9% de D-galactose, 3,8% de ácido galacturônico e massa molar de 3,74 x 10^4 $g.mol^{-1}$ (MANDAL, M.; DAS, A. Structure of the D-galactan isolated from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**, v. 86, p. 247, 1980).

[008]. No mesmo ano, os autores publicaram outro trabalho onde caracterizaram um polissacarídeo, identificado como uma β-D-glucomanana extraída da mesma forma com água a 100°C e repetidamente fracionada com cloreto de cálcio e solução de Fehling (MANDAL, M.; DAS, A. Structure of the glucomannan isolated from the leaves of *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate**

Research, v. 87, p. 249, 1980). Esta glucomanana apresentou uma relação manose:glucose de 22:1 e massa molar de $1,5x10^4$ $g.mol^{-1}$. As análises indicaram que a cadeia principal era formada por manose e glucose (1→4) ligadas, com ramificação em *O*-6.

[009]. As glucomananas parcialmente acetiladas são os principais polissacarídeos do EA, também denominadas de acemanana (FARKAS, A. **Topical medicament including poliuronide derived from aloe**. US3103466. Sep. 10, 1963; ZHANG, L.; TIZARD, I. R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. **Immunopharmacology**, v. 35, p. 119-128, 1996; REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 3-37, 1999; NI, Y. *et al.* Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1745-1755, 2004). Este polímero apresenta cadeias de tamanhos variáveis, maiores que 1000 kDa, formadas por unidades de manose e glucose β-(1→4) ligadas (LEE, J. K. *et al.* Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dentritic cells. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1275-1284, 2001; TURNER, C. C. *et al.* Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1727-1737, 2004).

[010]. Em média, cada unidade de manose do polissacarídeo possui um grupamento acetila em uma das três hidroxilas disponíveis do anel (DIEHL, B.; TEICHMULLER, E. E. *Aloe*

vera, quality inspection and identification. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 9, p. 14-16, 1998), característica esta que corrobora para a denominação de acemanana. A razão para esta variação é atribuída às mudanças sazonais e/ou ao efeito da localização geográfica dos cultivos (YARON, A. Characterization of *Aloe vera* gel before and after autodegradation, and stabilization of the natural fresh gel. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. S11-S13, 1993; NI, Y. *et al.* Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1745-1755, 2004; BOZZI, A. *et al.* Quality and authenticity of commercial *Aloe vera* gel powders. **Food Chemistry**, v. 103, p. 22-30, 2007; CAMPESTRINI, L. ***Aloe barbadensis* Miller: análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana**. 203 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007). Além da acemanana, outros polissacarídeos têm sido isolados do extrato obtido de folhas de *Aloe*, incluindo arabinanas, xilanas, arabinoramnogalactanas e pectinas (WOZNIEWSKI, T.; BLASCHEK, W.; FRANZ, G. Isolation and structural analysis of a glucomannan from the leaves of *Aloe arborescens* var. Miller. **Carbohydrate Research**, v. 198, p. 387-391, 1990; MABUSELA, W. T.; STEPHEN, A. M.; BOTHA, M. C. Carbohydrates polymers from *Aloe ferox* leaves. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3355-3558, 1990).

[011]. A determinação das posições dos grupos acetila nos polissacarídeos do EA ainda suscita dúvidas. Para a acemanana, foi determinado que os grupamentos acetila estariam localizados em C-2/C-3 e C-6 em uma razão de cerca 50:50 (MANNA, S.; McANALLEY, B. H. Determination of the position of the O-acetyl

group in a β-(1,4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**, v. 241, p. 317-319, 1993).

[012]. Esua e Rauwald (2006) isolaram do EA, extraído da planta em temperatura abaixo de 15°C, três novos compostos de natureza glicídica os quais foram denominados maloil-glucanas por constituírem-se de uma cadeia linear de glucanas substituídas em C-6 por um grupo maloíla. Estes compostos de baixa massa molar foram denominados de veracilglucanas A (monossacarídeo), B (dissacarídeo) e C (hexassacarídeo) (ESUA, M. F.; RAUWALD, J. W. Novel bioactive maloyl glucans from *Aloe vera* gel: isolation, structure elucidation and *in vitro* bioassays. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 355-364, 2006). Estes compostos foram caracterizados como 6-*O*-(1-L-maloil)-α,β-D-Glc*p* (veracilglucana A), α-D-Glc*p*-(1→4)-6-*O*-(1-L-maloil)-α,β-D-Glc*p* (veracilglucana B) e α-D-Glc*p*-(1→4)-tetra-[6-*O*-(1-L-maloil)-α-D-Glc*p*-(1→4)]-6-*O*-(1-L-maloil)-α,β-D-Glc*p* (veracilglucana C). Somente uma pequena massa de veracilglucana A pode ser isolada e esta se mostrou muito instável com o aumento da temperatura. As demais apresentaram estabilidade térmica.

[013]. Outras espécies de *Aloe* apresentam glucomananas com características químicas semelhantes à *A. barbadensis*. Glucomananas acetiladas são obtidas de *A. vahombe* e *A. arborescens*, com razão Man:Glc de 3:1 e 3,5:1, respectivamente (RADJABI, F.; AMAR, C.; VILKAS, E. Structural studies of the glucomannan from *Aloe vahombe*. **Carbohydrate Research**, v. 116, p. 166-170, 1983; WOZNIEWSKI, T.; BLASCHEK, W.; FRANZ, G. Isolation and structural analysis of a glucomannan from the leaves of *Aloe*

arborescens var. Miller. **Carbohydrate Research**, v. 198, p. 387-391, 1990).

Aplicações industriais e propriedades farmacológicas

[014]. Embora existam mais de 250 espécies do gênero *Aloe*, somente três ou quatro dessas apresentam relatos na literatura referentes a propriedades medicinais, sendo *A. barbadensis* a de maior interesse terapêutico e nutricional (ARAÚJO, P. S. *et al.* Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - Liliaceae). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 54-57, 1999). As aloes são plantas largamente utilizadas na medicina popular, no tratamento de queimaduras, em diabetes, hepatite, obesidade, controle das taxas de lipídios no sangue (OKAMURA, N. *et al.* Three chromone components from *Aloe vera* leaves. **Phytochemistry**, v. 43, p. 495-498, 1996; VAZQUEZ, B. *et al.* Antiinflamatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 69-75, 1996; SACCÙ, D.; BOGONI, P.; PROCIDA, G. *Aloe* exudates: Characterization by reverse phase HPLC and headspace CG-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4526-4530, 2001; BAUTISTA-PEREZ, R., SEGURA-COBOS, D., VÁSQUEZ-CRUZ, B. *In vitro* antibradykinin activity of *Aloe barbadensis* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 89-92, 2004; RODRIGUEZ, J. D. *et al.* Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 81-87, 2005) e ainda como agente cicatrizante, antiulcerativo, antineoplásico e antiviral (KIM, H.S.; KACEW, S.; LEE, B. M. *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1637-1640, 1999; PAEZ.,

A. *et al.* Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 133-139, 2000).

[015]. As atividades farmacológicas do EA são em sua maior parte atribuídas aos polissacarídeos (REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 3-37, 1999). Sugere-se, entretanto, que o EA exerça atividades terapêuticas por meio da interação sinergística de seus constituintes (FEMENIA, A. *et al.* Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999), incluindo alcalóides, saponinas, ácidos graxos, esteróis, minerais, vitaminas (A, C e E), aminoácidos e outros metabólitos secundários como as antraquinonas (YUSUF, S.; AGUNU, A.; DIANA, M. The effect of *Aloe vera* A. Berger (Liliaceae) on gastric secretion and acute gastric mucosal injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 33-37, 2004). Por outro lado, há relatos de que os polissacarídeos exercem atividade anti-tumoral sem qualquer ação sinergística com outros componentes (FEMENIA, A. *et al.* Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109-117, 1999).

Aspectos relacionados ao processo inflamatório

[016]. O processo inflamatório é uma resposta a estímulo lesivo, sendo evocado por ampla variedade de agentes nocivos. A capacidade de induzir uma resposta inflamatória é essencial à sobrevivência frente aos patógenos e agressões ambientais (MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-35, 2008; BRUNTON, L. *et al.* **Manual de**

farmacologia e terapêutica. Porto Alegre: AMGH, 2010). O desencadeamento deste processo pode se dar através de diferentes agentes, denominados flogísticos, físicos ou químicos. Dentre os fatores físicos pode-se citar queimadura ou congelamento, traumas, radiações UV e fraturas. Como exemplos de agentes químicos, pode-se citar os ácidos, bases, óleos e alguns polissacarídeos como a carragenina ou carragena. Pode ainda ser desencadeado por agentes biológicos como bactérias, fungos e vírus (CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmed, 2004).

[017]. A inflamação tem três papéis fundamentais no combate às infecções. O primeiro é o de oferecer células e moléculas efetoras adicionais aos sítios de infecção para aumentar a morte dos microorganismos invasores por macrófagos. O segundo é o de proporcionar uma barreira física, na forma de coagulação microvascular, para prevenir a propagação da infecção. O terceiro é o de promover o reparo dos tecidos danificados, uma tarefa não imunológica (LANGMEAD, L.; MAKINS, R. J.; RAMPTON, D. S. Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* gel in human colorectal mucosa *in vitro*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, p. 521-527, 2004). Em resumo, a inflamação é, na maioria das vezes, uma resposta protetora cuja função é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e das conseqüências dessa lesão (COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T (Eds.). **Robbins pathologic basis of disease**. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 1999. cap. 3, p. 50-88; ROTE, N.S. Inflammation. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E.

Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children. 3 ed. St. Louis: Mosby, 1998. cap. 7, p. 205-236).

[018]. As características clássicas de inflamação, como descrito por Celsus de "rubor" (vermelhidão), "tumor" (edema), "dolor" (dor), e calor são as manifestações sintomáticas nos tecidos em respostas a estímulos nocivos, tais como patógenos invasores, danos celulares e outros irritantes. As inflamações agudas e crônicas são caracterizadas por vários processos fundamentais, incluindo a exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, o recrutamento de leucócitos, e ativação celular e presença de mediadores do processo inflamatório no plasma. Em geral, este processo é auto limitante e conduz a um retorno do tecido e órgãos, para um estado normal tanto estrutural e funcional (LARSEN, G. L.; HOLT, P. G. The concept of airway inflammation. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, v.162, p. S2-S6, 2000; MANICONE, A. M.; McGURE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, p. 34-41, 2008).

[019]. A volta à normalidade envolve a neutralização e eliminação do agente agressor, normalização da permeabilidade vascular, cessação da infiltração leucocitária, apoptose dos neutrófilos presentes no sítio inflamatório e remoção dos corpos apoptóticos, corpos estranhos e resíduos celulares, eventos nos quais os macrófagos exercem um papel importante, reconhecendo e fagocitando os neutrófilos apoptóticos de maneira não flogística (GILROY, D. W. *et al.* Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 3, p. 401-16, 2004; KUMAR, V. ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.

Patologia Estrutural e Funcional. 7. ed. Guanabara-Koogan, 2007; WEIGERT, A.; JENNEWEIN, C.; BRÜNE, B. The liaison between apoptotic cells and macrophages—the end programs the beginning. **Biological Chemistry**, v. 390, p. 379-90, 2009).

Mediadores do processo inflamatório

[020]. O recrutamento de células inflamatórias para os locais de lesão envolve interações em concerto de vários tipos de mediadores solúveis, como o fator C5a do complemento, o fator de ativação plaquetária (PAF) e o eicosanoide LTB4, que podem agir como agonistas quimiotácticos. As citocinas como IL-1 e TNF-α desempenham papéis essenciais na orquestração do processo inflamatório, uma vez que são considerados os principais mediadores das respostas biológicas ao LPS bacteriano (BRUNTON, L. *et al.* **Manual de farmacologia e terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2010).

[021]. Os sinais clínicos do processo inflamatório são ocasionados devido ao aumento da permeabilidade vascular com consequente extravasamento de fluído para a área lesionada. Este processo é desencadeado através de mediadores químicos, que podem ser de origem plasmática ou celular. Os mediadores plasmáticos são as citocinas e o sistema complemento, processo de coagulação e o processo fibrinolítico. Estes mediadores estão na forma precursora e necessitam ser ativados para promover os seus efeitos biológicos.

[022]. Fazem parte dos mediadores celulares as aminas vasoativas (histamina, serotonina), os metabólitos derivados do ácido araquidônico (eicosanóides), as enzimas lisossomais, as metaloproteinases, os radicais livres derivados do oxigênio e o fator

de ativação plaquetária (PAF). Estes mediadores podem ser pré-formados ou sintetizados nas células ativadas, em resposta a um estímulo (BARNES, J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, p. 436-40, 1993).

[023]. Durante a inflamação aguda há liberação de vários mediadores. Esses mediadores químicos e seus alvos moleculares representam motivo de grande interesse, uma vez que constituem alvos farmacológicos importantes para drogas potencialmente anti-inflamatórias. Atualmente existem vários produtos, naturais e sintéticos, que são utilizados para o tratamento dos mais diversos processos inflamatórios. Entretanto, até o momento, não foi identificado o anti-inflamatório ideal, quer seja pela limitação de sua eficácia ou pela amplitude dos seus efeitos adversos. Neste aspecto, é importante salientar que, muitos dos anti-inflamatórios, de uso oral, disponíveis atualmente são capazes de induzir lesões gástricas por inibirem a síntese de prostaglandinas (PGs), o que representa uma importante limitação ao uso do produto. Assim, a procura por substâncias que apresentem potente atividade anti-inflamatória e efeitos adversos limitados continua sendo bastante estimulada na comunidade cientifica (SANTOS NETO, M. **Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antipirética do extrato hidroalcoólico bruto de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger em ratos**. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) – Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2009).

[024]. Dentre os produtos naturais, os polissacarídeos atraem a atenção da comunidade científica, uma vez que sua complexa

estrutura pode modular diversas ações fisiológicas e patológicas, como a inflamação (KANG, S. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 80-85, 2011). Desde a primeira década do século 21, ensaios com polissacarídeos são relatados, com resultados promissores na diminuição de edema e da adesão de macrófagos (POPOV, S. V. *et al.* Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 281-287, 2005; TONG, H. *et al.* Structural characterization and *in vitro* inhibitory activities in P-selectin mediated leukocyte adhesion of polysaccharide fraction isolated from the roots of *Physalis alkekengi*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 210-217, 2011).

[025]. Os exemplos mais clássicos de polissacarídeos utilizados como fontes de compostos anti-inflamatórios são o do sulfato de glucosamina e sulfato de condroitina, de origem animal, utilizados para tratamento de inflamações ósteo-articulares. Foi demonstrado que a absorção deste glucosaminoglicano via oral depende do tamanho da cadeia, densidade de cargas e presença elevada de grupos sulfatos. Após a administração, eles são quebrados em oligossacarídeos e polissacarídeos de menor massa molar, sendo assim enviados ao seu sítio de ação devido à presença de pontas redutoras, que são os marcadores de endereçamento, principalmente em cartilagens e líquido sinovial, onde atuam como redutores da inflamação e dor (RONCA, F. *et al.* Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 6, p. 14-21, 1998).

[026]. Polissacarídeos como as pectinas, glucanas, galactomanoglucanas e glucomananas foram alvos de investigação em experimentos *in vivo* e *in vitro*, demonstrando a capacidade de diminuir edema, inibir a permeabilidade capilar e estimulação da capacidade fagocítica (Da SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Bioactive polysaccharide from *Costus spicatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 239-242, 2003; BARRETO, S. W.; PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 287-291, 2006; Da SILVA, B. P. PARENTE, J. P. Chemical properties and antiinflammatory activity of a galactomannoglucan from *Arecastrum romanzoffianum*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 109-112, 2010).

[027]. Glucanas de origem vegetal, como as encontradas na cana-do-brejo (*Costus spicatus*), foram estudadas como possíveis candidatos a compostos anti-inflamatórios. As três glucanas encontradas nesta planta, possuem cadeia principal composta por ligações do tipo α-(1→3), com cadeias laterais de unidades glucopiranosil em α-(1→3), (1→6) e apresentaram efeito fagocítico e inibidor da permeabilidade capilar. Estas estruturas são altamente ramificadas e por consequência sua estrutura tridimensional dificulta a passagem para a circulação, quando ingeridas via oral. Os autores sugeriram que uma amilase humoral pode hidrolisar certas ligações como as α-(1→4) e possivelmente as α-(1→3), clivando as grandes moléculas de glucanas em polissacarídeos menores, porém longas o suficiente para exercer suas atividades (Da SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Bioactive polysaccharide from *Costus spicatus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 239-242, 2003). Uma glucana isolada do mesocarpo do fruto de

Orbignya phalerata aumentou a fagocitose in vivo e demonstrou efeito anti-inflamatório (Da SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 887-893, 2001).

[028]. Também β-glucanas de origem fúngica são alvo de estudos pela capacidade de atuar no processo de dor e inflamação. Muitos cogumelos do gênero *Agaricus, Lentinula e Pleurotus* foram investigados quanto às atividades biológicas (MARINO, R. H. *et al.* Morphomolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer strains in relation to luminosity and temperature of fructification. **Scientia Agricola**, v. 60, p.531-535, 2003). A glucana isolada do basidiomiceto *Geastrum saccatum*, injetada intravenosa mostrou redução do edema de orelha em camundongos, na ordem de 60,4% para a concentração de 10 $mg.kg^{-1}$ e 21,3% para 50 $mg.kg^{-1}$, demonstrando que altas concentrações não são eficazes na redução do edema (DORE, C. M. P. G. *et al.* Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β-glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1160-1169, 2007).

[029]. Trabalhos realizados com uma glucomanana acetilada obtida de bulbos de orquídeas do gênero *Cyrtopodium* mostrou-se eficaz na inibição da permeabilidade vascular, que é um primeiro estágio do processo inflamatório (BARRETO, S. W.; PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 287-291, 2006). Já, uma galactomanoglucana encontrada em mesocarpos de frutos do jerivazeiro mostrou potencial anti-inflamatório significativo no controle da fase inicial do processo

inflamatório, provocando uma inibição da formação de edema semelhante aos compostos de referência, indometacina e dexametasona. No entanto, o polissacarídeo exibiu menor atividade quando comparada com os controles na fase tardia da inflamação (Da SILVA, B. P. PARENTE, J. P. Chemical properties and antiinflammatory activity of a galactomannoglucan from *Arecastrum romanzoffianum*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 109-112, 2010).

[030]. Uma pectina isolada de *Comarum palustre*, denominada comarumana, apresentou efetividade de 59% em 24 h de ensaio, sendo que ao final do sétimo dia de avaliação, apresentou resposta anti-inflamatória de 29% (POPOV, S. V. *et al.* Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 281-287, 2005).

[031]. Polissacarídeos obtidos de flores de *Centaurea cyanus* demostraram atividade anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais, incluindo edema induzido por carragenina e óleo de cróton. Ácido galacturônico, arabinose, glucose, ramnose e galactose foram encontrados como sendo os principais componentes desses polissacarídeos (GARBACKI, N. *et al.* Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. **Journal od Ethnopharmacology**, v. 68, p. 235-241, 1999).

[032]. L-arabinanas isoladas de caldo de *Streptomyces fradiae* apresentaram atividade inibitória em edema induzido por carragenina (ARITA, H. et al Structural Studies on Anti-inflammatory Polysaccharides from *Streptomyces fradiae*. **Journal of Biochemistry**, v. 76, n. 4, p. 861-869, 1974)

[033]. Atividade anti-inflamatória do gel de *Aloe vera* tem sido largamente reportada por jornais científicos. Rubel (1983) discute o possível mecanismo do efeito anti-inflamatório de gel de *Aloe* (RUBEL, B. L. Possible mechanisms of the healing actions of *Aloe* gel. **Cosmetics and Toiletries**, v. 98, p. 109-114, 1983). Ukai *et al.* (1983) mostra a atividade anti-inflamatória de polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação de vários fungos. Os polissacarídeos apresentaram um significante efeito inibitório sobre edema induzido por carragenina. Um dos polissacarídeos testados, α-D-manana O-acetilada, demonstrou efeito de inibição maior que a fenilbutazona sobre hiperalgesia de queimadura em dois modelos de ensaio inflamatórios. A afirmação de que este polissacarídeo é purificado, livre de proteínas e lipídeos, fortemente sugere que o efeito anti-inflamatório é devido a manana acetilada presente (UKAI, S. Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, v. 6, n. 12, p. 983-990, 1983).

[034]. Os trabalhos descritos desde a década de 80 para a *Aloe barbadensis*, utilizaram extrato aquoso nos ensaios de atividade anti-inflamatória em diversos modelos como o de edema de pata, edema de orelha e modelos flogogênicos (DAVIS, R. H.; KABBANI, J. M.; MARO, J. P. Wound healing and antiinflammatory activity of *Aloe vera*. **Proceedings of the Pennsylvania Academy of Science**, v. 60, p. 79, 1986; DAVIS, R. H. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. **Journal of the American Pediatric Medical Association**, v. 79, p. 263-276, 1989; VAZQUEZ, B. *et al.* Antiinflamatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 69-75, 1996). Os resultados descritos apontaram para a atuação sinérgica dos

polissacarídeos e antraquinonas, presentes no extrato aquoso, como responsáveis pela ação anti-inflamatória (GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 16, p. 117-151, 1986; DAVIS, R.H. *et al.* Anti-Inflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 79, n. 6, p. 263-276, 1989; CAPASSO, F. *et al. Aloe* and its therapeutic use. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. S124-S127, 1998).

[035]. Um estudo realizado por Vázquez e colaboradores (1996), utilizou a fração polissacarídica bruta de *A. barbadensis,* que foi testada na dose de 100 $mg.kg^{-1}$ no ensaio de edema de pata e inibiu a formação de edema em uma percentagem semelhante à inibição produzida pelos agentes anti-inflamatórios bem estabelecidos, como a indometacina e dexametasona (VÁZQUEZ, B. *et al.* Antiinflamatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 69-75, 1996). Esta última por possuir características esteroidais inibe a enzima fosfolipase A_2, que é responsável pela liberação de ácido araquidônico, o substrato para a produção de prostaglandina (BLACKWELL, G. J. *et al.* Macrocortin: a polypeptide causing the antiphospholipase effect of glucocorticoid. **Nature**, v. 287, p. 147-149, 1980). Ao incubar microssomos contendo ciclooxigenase e ácido araquidônico marcado, foi gerado principalmente PGE_2. Este sistema, na presença do extrato aquoso ou também de indometacina, tiveram sua produção inibida. Dessa forma, os autores sugeriram que o efeito anti-inflamatório encontrado para o extrato aquoso de *A. barbadensis* está relacionado com a inibição da ciclooxigenase (VÁZQUEZ, B. *et al.* Antiinflamatory activity of

extracts from *Aloe vera* gel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 69-75, 1996).

[036]. Langmed, Makins, Rampton (2004) descrevem a atividade anti-inflamatória de gel de *Aloe vera* sugerindo um efeito terapêutico sobre doenças inflamatórias intestinais. Em ensaios *in vitro* o gel de *Aloe vera* foi capaz de inibir a produção de oxigênio reativo, inibir em 30% a produção de prostaglandina E_2 e a liberação de interleucina 8 (IL-8) caiu em 20%, todos os quais podem ser patogênicos em doença inflamatória intestinal (LANGMEAD, L.; MAKINS, R. J.; RAMPTON, D. S. Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* gel in human colorectal mucosa *in vitro*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, p. 521-527, 2004).

[037]. Em um estudo *in vivo*, realizado por Reuter et al (2008) o gel de *Aloe vera* apresentou efeitos anti-inflamatórios superiores ao gel de hidrocortisona inferindo uma possível utilização em tratamento tópico de condições inflamatórias da pele, tais como eritema induzido por ultravioleta (REUTER J. *et al.* Investigation of the anti-Inflammatory potential of *Aloe vera* gel (97.5%) in the ultraviolet erythema test. **Skin Pharmacology Physiology**, v. 21, p. 106-110, 2008).

[038]. Devaraj e Karpagam (2011) estudaram o efeito anti-inflamatório de extratos aquosos extraídos de folhas inteiras de *Aloe vera*. Como modelo experimental foi utilizado edema de pata em ratos induzido por carragenina e formaldeído. Os extratos em várias concentrações (100, 200, 400 e 600 mg/kg) reduziram significativamente o edema e a formação de granuloma de maneira dose dependente. A dose 600 mg/kg não apresentou toxicidade. Desta forma, sugere-se que o extrato aquoso de folhas

inteiras de *Aloe vera* pode ser utilizado em tratamentos de doenças inflamatórias (DEVARAJ, A.; KARPAGAM, T. Evaluation of anti-inflammatory activity and analgesic effect of *Aloe vera* leaf extracts in rats. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 3, 103-110, 2011).

[039]. Entre os componentes celulares, os monócitos/macrófagos são parte integrante da inflamação. Durante a inflamação, estas células são recrutadas para o local da inflamação pela destruição da barreira da matriz extracelular. Sua migração transendotelial é atribuída, em parte, à produção de metaloproteinase da matriz (MMPs). Muitos estudos relatam o envolvimento de aumento da expressão de MMPs em doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, mas os mecanismos ainda não são totalmente claros. A atividade anti-inflamatória de *Aloe vera* foi investigada através de estudos de inibição de MMP. O efeito de *A. vera* sobre a MMP-9, a inibição foi testado em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Os resultados do estudo revelaram uma downregulation *in vitro* de MMP-9 por *Aloe vera* em PBMC, inferindo, portanto, uma evidência de apoio a utilização de gel de *Aloe vera* como um medicamento anti-inflamatório (VIJAYALAKSHMI, D. *et al. In vitro* anti inflammatory activity of *Aloe vera* by down regulation of MMP-9 in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 542-546, 2012).

[040]. Outras pesquisas tem reportado efeitos anti-inflamatórios de polissacarídeos extraídos do gênero *Aloe* (t' HART, L. A. *et al.* An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of

Aloe vera. **Planta Medica**, v. 55, n. 6, p. 509-512, 1989; DAVIS, R. H. *et al.* Anti-Inflammatory & wound healing activity of a growth substance in *Aloe*. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 84, n. 2, p. 77-81, 1994; YAGI, A.; TAKEO, S. Anti-inflammatory constituents, *Aloe*sin and *Aloe*mannan in *Aloe* species and effects of Tanshinon VI in *Salvia miltiorrhiza* on heart. **Yakugaku Zasshi**, v. 123, n. 7, p. 517-532, 2003) e extratos hidroetanólicos (DAVIS, R. H. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 79, n. 6, p. 263-276, 1989; DAVIS, R. H. *et al.* The isolation of an active inhibitory system from an extract of *Aloe vera*. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 81, n. 5, p. 258-61, 1991; SILVA, M. A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* haw on thermal injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 393-401, 2013).

[041]. Ndhlala et al (2009) estudaram a evolução das atividades antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória, bem como os efeitos genotóxicos de diferentes extratos obtidos de cascas, folhas e raízes de *Aloe barberae*. Os extratos obtidos com éter de petróleo e diclorometano exibiram boa atividade contra as todas as bactérias testadas e contra o fungo *Candida albicans* com concentrações inibitórias mínimas variando entre 0,195-1,56 $mg.ml^{-1}$. Os extratos obtidos com éter de petróleo apresentaram atividade anti-inflamatória >70% nos ensaios que avaliaram a COX-1 e COX-2. Todos os extratos restantes mostraram atividade moderada (40-69%) no ensaio de COX-1. Nenhum dos extratos testados apresentou efeito mutagênico (NDHLALA, A. R. Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the

South African tree *Aloe* (*Aloe barberae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 404–408, 2009).

[042]. Diversos são os documentos que relatam a atividade de carboidratos no tratamento de doenças inflamatórias.

[043]. A invenção **CN102362869** descreve a aplicação do polissacarídeo de *Salvia miltiorrhiza* na preparação de medicamentos anti-inflamatórios. Em particular, relata a influência de polissacarídeos de *Salvia miltiorrhiza* sobre reações alérgicas em ratos ao dinitrofluorobenzeno (DNFB), influência sobre a linfopoese e expressão de fator inflamatório induzido pelo contato ao DNFB utilizando ensaios em células e biologia molecular. Resultados evidenciaram que polissacarídeos de *Salvia miltiorrhiza* possuem efeito anti-inflamatório (XU, D. *et al.* **Application of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharide in preparation of anti-inflammatory drug.** CN102362869. Feb. 29, 2012).

[044]. **WO2011147768** relata o uso de polissacarídeos de semente de tamarindo como anti-inflamatório em composições farmacêuticas ou dermocosméticas. As composições contendo esses polissacarídeos são particularmente utilizadas sob administração tópica no tratamento de inflamações de pele e mucosa (GIORI, A.; ARPINI, S.; TOGNI, S. **Tamarind seed polysaccharide for use in the treatment of inflammatory diseases.** WO2011147768, Dec. 1, 2011).

[045]. **WO2013144909** trata de uma composição tópica contendo uma mistura de oligossacarídeos sulfatados. Esses oligossacarídeos são obtidos de algas verdes (gênero Ulva) após processo de clivagem enzimática das ulvanas. Ao final, os oligossacarídeos apresentam grau de polimerização entre 2-10.

Esta composição apresenta potencial atividade sobre a pele, incluindo atividade anti-inflamatória, anti-radical, efeitos de despigmentação, efeitos sobre moléculas da matriz extracelular dermal e epidermal (GRIZAUD, C. M. **Topical composition bioactive sulfated oligosaccharides and cosmetic uses.** WO2013144909. Oct. 3, 2013).

[046]. O documento de invenção **KR101286140** trata de uma composição cosmética contendo polissacarídeos extraídos de raízes de lótus com propriedades hidratantes e anti-inflamatórias. Essa composição contém 0,005-5% em peso dos polissacarídeos e é capaz de aliviar irritação da pele, suprimir eritema causado por raios ultravioletas e tratar de inflamação da pele e irritação (SOO, K. Y. *et al.* **Cosmetic composition for moisturizing and anti-irritation of skin containing polysaccharide from *Nelumbo nucifera* rhizome.** KR101286140. Jul. 15, 2013).

[047]. A patente **JP2009298702** propõe uma composição de administração oral que pode ser tomada por um longo período de tempo, sem efeitos colaterais graves e apresenta atividade anti-inflamatória para artrite aguda e crônica. Esta composição caracteriza-se por conter como princípio ativo manoproteínas ou α-mananas extraídas de levedura (YOSHIKAZU, T.; TOSHIFUMI, Y.; YOSHIO, K. **Oral administration composition.** JP2009298702. Dec. 24, 2009).

[048]. Os documentos de invenção **JP2008007505** e **JP5186819** evidenciam uma composição anti-inflamatória contendo β-1,4-manobiose como princípio ativo. Esta composição é capaz de inibir a produção de interleucina 8 (IL-8), tendo efeitos de prevenção à septicemia, reumatismo e doenças inflamatórias

intestinais, ou ainda mitigar estes sintomas (FUTOSHI, Y. *et al.* **Anti-inflammatory composition and agent, and food/drink and feed each containing the same.** JP2008007505. Jan. 17, 2008; FUTOSHI, Y. *et al.* **Anti-inflammatory composition and agent, and food/drink and feed each containing the same.** JP5186819. Apr. 24, 2013).

[049]. Abaixo apresentamos a descrição dos documentos de patentes relacionados à extração de polissacarídeos de *Aloe* e atividade anti-inflamatória. Tais documentos não coincidem com nossa proposta e, portanto não afetam a originalidade da criação.

[050]. Os documentos de invenção **WO8700052**, **EP0328775**, **US4735935**, **US4851224**, **US4917890**, **US4957907**, **US4959214**, **US4966892** e **WO9710834** reivindicam o processo de extração de um polissacarídeo farmaceuticamente ativo obtido a partir de *Aloe*. Este polissacarídeo, uma acemanana, é o componente ativo do Carrisyn®, um produto comercial isolado e desenvolvido pela *Carrington Laboratories, Inc*. a partir do gel de folhas de *Aloe barbadensis* Miller. Carrisyn® contém entre 73-90% de acemananas. É produzido através da remoção da bainha exterior da folha, seguida da remoção e processamento da mucilagem (ajuste do pH, extração etanólica, liofilização e moagem). O rendimento do processo da extração é de aproximadamente 0,2% p/v em relação ao gel de *Aloe* obtido após remoção da casca. O polissacarídeo é essencialmente composto por unidades de β-(1→4)-D-manopiranosil. Apresenta cadeia randomicamente substituída com grupos acetila ligados ao polímero em C-3, C-3,6 ou C-6. O grau de acetilação é aproximadamente 0,8 grupo acetila/monômero. Este polissacarídeo é heterogêneo com peso molecular maior que 10 kDa (McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products,**

products produced thereby and compositions thereof. WO8700052. Jan. 15, 1987; McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products, products produced thereby and compositions thereof.** US4735935. Apr. 5, 1988; McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products, products produced thereby and compositions thereof.** EP0328775. Jun. 20, 1988; McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products.** US4851224. Jul. 25, 1989; McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products, products produced thereby and compositions thereof.** US4917890. Apr. 17, 1990; McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products.** US4957907. Sep. 18, 1990; McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products, products produced thereby and compositions thereof.** US4959214. Sep. 25, 1990; McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products, products produced thereby and compositions thereof.** US4966892. Sep. 30, 1990; SHAND, D. G.; MOORE, D.; McANALLEY, B. H.; RODRIGUEZ, S. **Bioactive factors of *Aloe vera* plants.** WO9710834. Mar. 27, 1997).

[051]. Os documentos de patentes **US5118673**, **WO9308810**, **US5441943**, **US5468737**, **US5587364** e **US5786342** tratam do uso de acemanana obtida de *Aloe* sp., a partir do processo descrito anteriormente, em diferentes tratamentos nos quais a cura envolve intervenção no sistema imune do paciente. Descrevem o uso dessa acemanana no tratamento de doenças virais, câncer, doenças respiratórias ou imunoregulatórias, hipercolesterolemia, diabetes, aterosclerose, inflamações, infecções, infestações, lesões na pele (CARPENTER, R. H.; MCDANIEL, R. H.; MCANALLEY, G. P. **Uses of Aloe products.** US5118673. Jun. 2, 1992; McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Uses of Aloe products, e.g. acemannan, in the treatment of diseases requiring intervention of the immune system**

for cure. WO9308810. May 13, 1993; McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Uses of Aloe products.** US5441943. Aug. 15, 1995; McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Wound healing accelerated by systemic administration of polysaccharide from aloe.** US5468737. Nov. 21, 1995; McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Uses of Aloe products in the treatment of inflammatory diseases.** US5587364. Dec. 24, 1996; CARPENTER, R. H.; MCDANIEL, R. H.; MCANALLEY, G. P. **Uses of Aloe products in the treatment of chronic respiratory diseases.** US5786342. Jul. 28, 1998).

[052]. As invenções **EP0619117**, **US5780453** e **EP0965345** relatam o uso de acemananas, obtidas conforme processo descrito anteriormente, na manufatura de medicamentos para uso como adjuvante em vacinas, produção de vírus com defeito, tratamento de doença inflamatória no intestino, correção de síndromes de maturação de células da mucosa, tratamento de esclerose múltipla e correção de má absorção. Mais especificamente tratam de um método de produção de vírus com defeitos em humanos, através da administração de quantidade suficiente de acemanana para estimular monócitos e macrófagos e alterar o metabolismo de replicação viral em células infectadas com vírus (McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Use of acemannan.** EP0619117. Oct. 12, 1994; McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Use of Aloe products in the treatment of multiple sclerosis.** US5780453. Jul. 14, 1998; McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Use of acemannan.** EP0965345. Dec. 22, 1999).

[053]. **WO9001253, EP0382840, US5106616** evidenciam as propriedades de acemananas, obtidas conforme processo descrito

anteriormente, como indutoras de interleucina 1 (IL-1) e prostaglandina E_2 (PGE_2). A IL-1 está associada com a atividade ou produção de produtos de linfócitos T, fibroblastos, linfócitos B e células endoteliais. Acemanana é atóxica e a administração de quantidade suficiente de acemanana para estimular monócitos e macrófagos, não só produz IL-1 e PGE2 mas também estimula a fagocitose, a produção de anticorpo, aumenta a atividade antiviral no soro e, em pacientes com AIDS, produz vírus HIV defeituoso. Acemanana mostrou-se também capaz de afetar a taxa de produção de vírus em culturas através da aceleração da taxa de replicação viral. Além disso, acemanana é um adjuvante potente para vacinas virais em galinhas e mostrou atividade antitumoral específica contra sarcóides, em cavalos (McANALLEY, B. H. **Aloe compositions and uses thereof.** WO9001253. Fev. 22, 1990; McANALLEY, B. H. **Aloe compositions and uses thereof.** EP0382840. Aug. 22, 1990; McANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; McDANIEL, H. R. **Administration of acemannan.** US5106616. Apr. 21, 1992).

[054]. A invenção **JPH02231408** trata de um medicamento para pele contendo extrato de *Aloe* composto de ácido elágico e sais de metais alcalinos atuando como anti-inflamatório (MAKOTO, E. *et al.* **Novel skin drug for external use.** JPH02231408. Sep. 13, 1990).

[055]. É conhecido que as acemananas (descritas no estado da técnica), polímeros de alta massa molar (≥ 1000 kDa), formados principalmente por unidades de manose acetilada, induzem linfócitos e macrófagos para produzir uma ampla gama de substâncias ativas imunologicamente, inclusive fatores atuantes contra inflamação. Os polímeros de baixa massa molar, derivados

das acemananas, embora mantenham unidades monossacarídicas semelhantes apresentam características físico-químicas e biológicas diferentes, podendo difundir-se melhor nos tecidos e chegar à corrente sanguínea, atuando de forma local ou sistêmica, com mais facilidade que moléculas grandes.

[056]. O(s) modo(s) de ação destes polissacarídeos biologicamente ativos permanece(m) continuamente sob estudo, no entanto, a estrutura, massa molar e grau de acetilação destes polímeros e os tipos de variações estruturais parecem, portanto, ser os fatores que controlam sua atividade farmacológica.

[057]. Um grande problema associado com extração de polissacarídeos de *Aloe* é a degradação das substâncias ativas, como grupos acetila, por hidrólise. McANALLEY (1990) sugere que a atividade biológica do extrato obtido a partir de gel de *Aloe* é diretamente proporcional a quantidade de grupos *O*-acetil presentes (McANALLEY, B. H. **Process for preparation of Aloe products, products produced thereby and compositions thereof.** US4917890. Apr. 17, 1990). A presença dos grupos acetila faz-se necessária para as atividades biológicas, uma vez que eles bloqueiam grupos hidroxilas (hidrofílicos) e, assim, tornam a molécula capaz de atravesar barreiras hidrofóbicas na célula (REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 3 - 37, 1999).

Descrição da abordagem do problema técnico

[058]. O processo de extração aqui descrito foi combinado de maneira inédita, gerando produtos que constituem alternativas economicamente viáveis e que se mostraram mais eficazes ao tratamento anti-inflamatório que produtos hoje disponíveis. Dessa

forma a presente invenção proporciona um produto ativo mais específico a partir de *Aloe barbadensis* Miller. Portanto o principal objetivo desta invenção é a obtenção de um polissacarídeo linear de baixa massa molar (<5 kDa) formado principalmente por unidades de manose acetilada, a partir de uma despolimerização enzimática da fração polissacarídica de *Aloe barbadensis* Miller, segundo os processos e etapas aqui descritos, que apresenta propriedades anti-inflamatórias.

[059]. O primeiro objeto desta invenção trata dos de preparação e produção, que permitem a obtenção de um produto, a partir de uma fração polissacarídica de *Aloe*, obtendo um polissacarídeo de baixa molar formado principalmente por unidades de manose acetilada. A presente invenção, de maneira diferente ao estado da arte, mostra-se como um método que proporciona à obtenção de um polímero puro, de baixa massa molar, altamente solúvel, através de um método que mantém a integridade da estrutura mãe previnindo a degradação dos grupamentos acetil.

[060]. O segundo objeto desta invenção trata do uso do referido despolimerizado enzimático no tratamento de doenças inflamatórias e redução dos respectivos sintomas causados pela inflamação.

[061]. A invenção também se refere a uma composição farmacêutica ou dermocosmética com propriedades anti-inflamatórias que compreendenda um polissacarídeo de baixa massa molar, obtido a partir de despolimerização enzimática de polissacarídeos de *Aloe*, como ingrediente ativo, misturado com um ou mais excipientes aceitáveis.

[062]. Além disso, a invenção diz respeito a um método de tratamento, em paciente portadores de algum tipo de inflamação, que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do despolimerizado enzimático de polissacarídeos de *Aloe*.

Citação das Figuras

[063]. A seguir, faz-se referência ao desenho anexo ao texto para melhor compreensão dos exemplos e concretizações apresentados:

[064]. FIGURA 1 - representa a estrutura química da fração polissacarídica (FP) obtida de *Aloe barbadensis* Miller

[065]. FIGURA 2 - representa a estrutura química do despolimerizado enzimático obtido a partir da fração polissacarídica (SP) obtida de *Aloe barbadensis* Miller

[066]. FIGURA 3 - efeito do tratamento de 24 h com a fração FP e SP sobre a morfologia de macrófagos peritoneais de camundongos. Em (a), células não tratadas, (b) células tratadas com LPS 50 ηg.mL^{-1}, (c) e (d) células tratadas com a fração FP 10 e 160 μg.mL^{-1}, (e) e (f) células tratadas com a fração SP 10 e 160 μg.mL^{-1}, respectivamente. As setas apontam as projeções citoplasmáticas e os vacúolos; n – núcleo, c – citoplasma.

[067]. FIGURA 4 - efeito de SP na viabilidade celular no tempo 24 h, nas concentrações de 2,5; 10; 40; 160 e 640 μg mL^{-1}. Cada barra representa a Média±EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata. *Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

[068]. FIGURA 5 - efeito de SP na viabilidade celular no tempo 48 h, nas concentrações de 2,5; 10; 40; 160 e 640 μg mL^{-1}. Cada barra representa a Média±EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata. *Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

[069]. FIGURA 6 - efeitos de SP na produção de citocinas TNF-α por macrófagos aderentes incubados por 24 h, na ausência (controle) e presença das amostras. Cada barra representa a Média±EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata. *Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

[070]. FIGURA 7 - efeitos de SP na produção de citocinas IL-6 por macrófagos aderentes incubados por 24 h, na ausência (controle) e presença das amostras. Cada barra representa a Média±EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata. *Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

[071]. FIGURA 8 - efeitos de SP na produção de citocinas IL-10 por macrófagos aderentes incubados por 24 h, na ausência (controle) e presença das amostras. Cada barra representa a Média±EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata. *Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

[072]. FIGURA 9 - efeitos de SP na produção de citocinas IL-1β por macrófagos aderentes incubados por 24 h, na ausência (controle) e presença das amostras. Cada barra representa a Média±EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata.

*Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

[073]. FIGURA 10 - efeitos das amostras na produção de óxido nítrico por macrófagos aderentes incubados por 48 h, na ausência (controle) e presença das amostras. LPS 50 ηg mL^{-1} foi utilizado como controle positivo. Cada barra representa a Média±EPM de pelo menos 2 experimentos independentes cada um em triplicata. *Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

[074]. FIGURA 11 - representa o efeito de SP na concentração de 20 μg.$pata^{-1}$, no ensaio de edema induzido pela carragenina administrada intraplantarmente. Dexametasona 0,5 mg.kg^{-1} intraplantar foi utilizada como controle positivo. Cada barra representa a Média±EPM de 5 animais. *Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

[075]. FIGURA 12 - representa o efeito anti-inflamatório das amostras administradas pela via sub-cutânea (10 mg.kg^{-1}), no ensaio de edema induzido pela carragenina, após 120 min. Dexametasona 0,5 mg.kg^{-1} intraplantar foi utilizada como controle positivo. *Diferença significativa em relação ao controle (Teste de Tukey, $p<0,05$).

Descrição detalhada da Invenção

[076]. A presente invenção refere-se à obtenção de um despolimerizado enzimático a partir da polpa das folhas de *Aloe* sp.

[077]. O processo envolve primeiramente a remoção da polpa das folhas de *Aloe* sp. e sua secagem/liofilização. Após este

processo de desidratação, o material segue para moagem (<300 mesh), solubilização em água purificada e centrifugação/ filtração. Ao sobrenadante obtido adiciona-se solvente orgânico polar (etanol, metanol, isopropanol, *n*-propanol, acetona, etc), preferencialmente etanol, em proporção 1:2-8 (v/v), preferencialmente 1:5-6 (v/v), seguido de agitação e repouso sob refrigeração por pelo menos 12 horas. O precipitado é então isolado por centrifugação/filtração seguido de secagem e moagem. Este material é novamente solubilizado em água purificada, numa concentração de 0,1-10 $g.L^{-1}$ (p/v), preferencialmente entre 0,5-1,5 $g.L^{-1}$ (p/v), e submetido à centrifugação/filtração. O sobrenadante gerado é então dialisado seguido de secagem/liofilização originando uma fração polissacarídica.

[078]. Esta fração polissacarídica é despolimerizada enzimaticamente, utilizando enzima endo-1→3(4)-β-D-glucanase. Ao final do tratamento enzimático, o material deve ser filtrado em membrana de 0,45 μm e seco/liofilizado. Este material pode ser submetido a cromatografia de exclusão por tamanho, utilizando fase estacionária com limite de exclusão entre 1-3000 Mw, preferencialmente entre 80–2000 Mw e água purificada como fase móvel. Ao final do processo obtém-se um despolimerizado enzimático.

[079]. A primeira etapa do processo gera uma fração polissacarídica que compreende uma β-D-glucomanana, 4-ligada, parcialmente acetilada, de alta massa molar (~1500 kDa), com razão manose:glucose de 24:1, grau de acetilação de 18,4%, grau

de substituição (DS) de 0,84 com grupamentos acetil ligados a C-2, C-3, C-2/C-3 e C-6.

[080]. O despolimerizado enzimático, obtido a partir da fração polissacarídica compreende um polissacarídeo de baixa massa molar (~4 kDa) formado por 98% de manose, 2% de glucose e com 15% de acetilação, o que corresponde a um grau de substituição (DS) de 0,66. Esta fração assemelha-se estruturalmente à fração que a originou, diferindo-se principalmente em massa molar.

[081]. A determinação da atividade anti-inflamatória foi realizada por testes *in vivo*. Para os bioensaios o despolimerizado enzimático foi ressuspendido até concentração pré-determinada. Os exemplos desta invenção comprovam a atividade do despolimerizado enzimático obtido de *Aloe* sp.

[082]. O ensaio realizado para verificação da atividade é uma adaptação da metodologia proposta por Winter, Risley e Nuss (WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflamatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.). Essa metodologia determina *in vivo* a capacidade anti-inflamatória de moléculas através da indução de edema de pata por carragenina.

[083]. Análise estatística dos resultados obtidos mostrou que o despolimerizado enzimático apresentou perfil anti-inflamatório superior ao fármaco de referência, sugerindo que fatores como a massa molar, a conformação molecular e o grau de acetilação das frações sejam determinantes na ação anti-inflamatória.

[084]. O despolimerizado enzimático obtido a partir de *Aloe* sp. pode ser utilizado *in vivo* como agente único ou em combinação à outros agentes terapêuticos conhecidos.

[085]. A presente invenção é explicada em mais detalhes pelos exemplos a seguir, porém não é limitada pelos referidos exemplos.

Exemplo 1 - Processo extrativo dos polissacarídeos

[086]. As folhas lavadas de *Aloe barbadensis* foram submetidas à remoção manual da epiderme e parênquima clorofiliano (popularmente denominado de casca) para obtenção da polpa das folhas (parênquima de reserva). Essa polpa foi triturada em liquidificador até desagregação total do tecido e liofilizada. A seguir, o material foi reidratado com água purificada até obtenção de uma massa com aspecto gelatinoso. O material foi então centrifugado e ao sobrenadante obtido adicionou-se etanol 92° GL gelado, numa proporção de seis vezes o seu volume. Após precipitação (12 h a 4°C), o material foi filtrado e o retido obtido foi seco em estufa a 50°C, seguido de moagem em moinho para minerais. Esta fração bruta obtida foi solubilizada em água (1 $g.L^{-1}$) e submetida à centrifugação (17000 x g, 30 min, 4°C). O sobrenadante foi dialisado em membrana de acetato de celulose (limite de exclusão de 12-14 kDa) e liofilizado, originando a fração polissacarídica (FP). A composição da fração polissacarídica obtida é demonstrada abaixo (Tabela 1).

TABELA 1 – RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA OBTIDA DE *Aloe barbadensis*.

Rendimento (%)[a]	Carboidratos Totais (%)[b]	PTN (%)[c]	Acetil (%)[d]	Composição Monossacarídica (mol%)		
				Man[e]	Glc[e]	UA[f]
23,4	79,2	1,3	18,4	94,2	3,9	1,9

[a]Rendimento em relação a massa liofilizada da polpa das folhas; [b]DUBOIS *et al.* (1956); [c]BRADFORD (1976); [d]HESTRIN (1949); [e]Man: Manose, Glc: Glucose, monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por cromatografia gasosa (CG); [f]UA: Ácidos Urônicos quantificados por FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991).

[087]. O espectro de RMN de ^{13}C de FP mostra um sinal anomérico intenso em 100,2 ppm, atribuído ao C-1 de unidades β-manopiranosil. No espectro de RMN de ^{1}H de FP, os sinais anoméricos em 4,75 e 4,71 ppm estão de acordo com a presença de ligação β-glicosídica.

[088]. A partir dos experimentos de HSQC, as correlações de 100,2/4,75; 4,71; 70,1/4,10; 71,5/3,79; 76,8/3,82; 75,1/3,61; 3,54; 3,46 e 60,6/3,75; 3,88 ppm foram atribuídos a C-1/H-1–C-6/H-6a,b, respectivamente, das unidades β-D-manopiranosil 4-ligadas (VAN HAZENDONK, J. *et al.* Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.). **Carbohydrate Research**, v. 291, p. 141-154, 1996; HANNUKSELA, T.; PENHOAT, C. H. NMR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 301-312, 2004).

[089]. No espectro de RMN de ^{13}C de FP, o sinal de muito baixa intensidade em 102,5 ppm (correlacionando com o H-1 em 4,52 ppm no experimento de HSQC) indica a presença de unidades β-glucopiranosil 4-ligadas. Correlações no experimento de HSQC em 73,1/3,36 e 77,1/3,66 ppm foram atribuídas a C-2/H-2 e C-4/H-4, respectivamente, das unidades acima mencionadas

(CAPEK, P.; ALFÖLDI, J.; LIŠKOVÁ, D. An acetylated galactoglucomannan from *Picea abies* L. Karst. **Carbohydrate Research**, v. 337, 1033-1037, 2002; HANNUKSELA, T.; PENHOAT, C. H. NMR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 301-312, 2004; SIMS, I. M.; CRAIK, D. J.; BACIC, A. Structural characterization of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 79-92, 1997).

[090]. O espectro de RMN de ^{13}C de FP também apresentou sinais de carbonos metílicos em 20,2 (mais intenso) 20,0 (médio) e 20,5 (menor) ppm e carbonos carbonílicos (173,8 e 173,0 ppm) de grupos acetila, indicando que FP contém uma manana acetilada. O espectro de RMN de ^{1}H desta fração apresentou quatro sinais correspondentes aos grupos metila em 2,15 (mais intenso), 2,10 (médio), 2,19 e 2,18 (menor) ppm, indicando que os grupos acetila, estão localizados em ambientes químicos diferentes. O espectro de HSQC mostrou que estes prótons metílicos estão correlacionados com os carbonos metílicos, acima mencionadas, de grupos acetila (20,2/2,15; 2,10; 20,0/2,18; 2,19 e 20,5/2,18, 2,19 ppm).

[091]. O espectro de HSQC de PF também apresentou correlações em 98,9/4,87 (C-1/H-1), 71,5/5,45 e 71,7/5,38 (C-2/H-2), 70,1/4,03 70,1/3,97 (C-3/H-3), atribuído a unidades β-manopiranosil 2-acetiladas (HANNUKSELA, T.; PENHOAT, C. H. NMR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 301-312, 2004; TELEMAN *et al.* Isolation and

characterization of *O*-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 525-534, 2003; VAN HAZENDONK, J. *et al.* Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.). **Carbohydrate Research**, v. 291, p. 141-154, 1996). A presença de unidades de manose 2-*O*-acetiladas em diferentes ambientes químicos foi confirmada pelas correlações observadas no espectro de COSY correspondentes a H-1/H-2 (4,87/5,38 ppm) e dois conjuntos de H-2/H-3 (5,38/3,97 e 5,45/4,03 ppm) (VAN HAZENDONK, J. *et al.* Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.). **Carbohydrate Research**, v. 291, p. 141-154, 1996; HANNUKSELA, T.; PENHOAT, C. H. NMR structural determination of dissolved *O*-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 301-312, 2004).

[092]. O espectro ^{13}C DEPT de FP apresentou um sinal invertido em 63,1 ppm atribuído a C-6 das unidades manopiranosil 6-*O*-acetiladas. Esta ressonância foi deslocada para campo baixo (2,5 ppm) em comparação com C-6 não substituído (60,6 ppm, também DEPT invertido).

[093]. No espectro de RMN de ^{13}C de FP o sinal de baixa intensidade em 99,7 ppm foi atribuído a C-1 de unidades β-manopiranosil 3-acetiladas, 4-ligadas (HANNUKSELA, T.; PENHOAT, C. H. NMR structural determination of dissolved *O*-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 301-312, 2004; VAN HAZENDONK, J. *et al.* Structural analysis of acetylated hemicellulose

polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.). **Carbohydrate Research**, v. 291, p. 141-154, 1996). Além disso, as correlações do espectro de HSQC em 68,7/4,18 e 73,6/5,03 ppm foram assinaladas para C-2/H-2 e C-3/H-3, respectivamente das unidades manopiranosil 3-acetiladas, de acordo com a mudança para campo baixo de H-2, H-3 e C-3, bem como o deslocamento para campo alto de C-2, quando comparadas com as respectivas ressonâncias das unidades β-manopiranosil 4-ligadas (VAN HAZENDONK, J. *et al.* Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.). **Carbohydrate Research**, v. 291, p. 141-154, 1996). Para as referidas unidades de manose acetiladas o espectro de COSY mostrou dois conjuntos de correlações H-3/H-4 (5,03/4,04 e 5,03/4,08 ppm), provavelmente, indicando diferenças no padrão de acetilação das unidades monossacarídicas vizinhas.

[094]. No espectro de HSQC as correlações anoméricas em 98,3/4,98 e 98,3/4,97 ppm em conjunto com outras em 69,7/5,47; 69,7/5,40 (C-2/H-2), 71,9/5,17 (C-3/H-3) e 73,1/4,08 (C-4/H-4) mostraram que FP também contém unidades de manose 2,3-diacetiladas. O espectro de COSY mostrou correlações em 4,98/5,47 e 4,97/5,40 (H-1/H-2); 5,47/5,17 e 5,40/5,17 ppm (H-2/H-3) e 5,17/4,08 (H-3/H-4). Estes dados estão de acordo com o deslocamento para campo baixo dos prótons germinais H-2 (1,37-1,30 ppm) e H-3 (1,38 ppm) e os prótons vicinais (0,22 a 0,27 ppm para H-1 e 0,26 ppm para H-4), devido à presença de grupos acetila em ambos, O-2 e O-3 de unidades β-D-manopiranosil 4-ligadas.

[095]. No espectro de HSQC as correlações em 63,1/4,28; 4,48 ppm correspondentes aos C-6/H6a,b confirmaram que FP contém unidades manopiranosil C-6 substituídas por grupos acetila. Os deslocamentos para campo baixo de C-6, H-6a e H-6b correspondem as unidades manopiranosil 6-acetiladas (2,5, 0,53 e 0,60 ppm, respectivamente).

[096]. As ressonâncias do carbono C-6 de unidades não substituídas e acetiladas em C-6 apresentaram integrações relativas de 1:0,58 mostrando que FP representa 37% do total de unidades de manopiranosil contendo grupos acetila em O-6. Além disso, no espectro de HSQC de FP a correlação em 72,6/3,66 ppm foi atribuída a C-5/H-5 de unidades manopiranosil 6-*O*-acetiladas. Os deslocamentos de C-5 para campo alto (2,5 ppm) e H-5 para campo baixo (0,05 a 0,20 ppm) estão de acordo com o efeito do grupo acetila em C-6 no carbono e próton vicinal (CESCUTTI, P. *et al.* *O*-acetyl localization on Cepacian, the principal exopolysaccharide of *Burkhlderia cepacia* complex bacteria. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2905-2912, 2011). A percentagem de 38% obtida a partir das integrações relativas das áreas de C-5, está de acordo com a determinada a partir das áreas dos carbonos C-6 (37%).

[097]. Por conseguinte, as técnicas de RMN, juntamente com as análises químicas mostram que FP consiste de uma β-D-glucomanana, 4-ligada, parcialmente acetilada, de alta massa molar (1230 kDa), com razão manose:glucose de 24:1, grau de acetilação de 18,4%, grau de substituição (DS) de 0,84 com grupamentos acetila ligados a C-2, C-3, C-2/C-3 e C-6 (FIGURA 1).

Exemplo 2 - Despolimerização enzimática de fração polissacarídica

[098]. A fração polissacarídica foi dissolvida (3 $mg.mL^{-1}$) em tampão acetato 100 mM, pH 4,5, a 45°C. A seguir, 1U (4 μL) de endo-1→3(4)-β-D-glucanase (Viscozyme L® – 100 FBG/g, Novozymes®, Dinamarca) foi adicionada e a solução foi incubada por 8 h a 45°C. A reação foi finalizada com aquecimento a 100°C por 10 min, e após resfriamento procede-se com uma filtração em membrana de 0,45 μm. O filtrado resultante foi congelado e liofilizado representou 6,5% p/p, em relação à fração polissacarídica inicial. Este material foi então submetido à cromatografia de exclusão por tamanho empregando-se uma coluna cromatográfica de dimensões 160 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro interno, preenchida com 500 mL BioGel P2® (Biorad, limite de exclusão 100–1800 Mw) utilizando como fase móvel água purificada (1 $mL.min^{-1}$). O material excluído foi então dividido em duas subfrações: A (190-230 mL) e B (230–500 mL), correspondendo a rendimentos de 17 e 83%, respectivamente.

[099]. Análises químicas da subfração B permitiram identificar a presença de oligossacarídeos de dp 3 a dp 11 com variáveis graus de acetilação. Análises químicas da subfração A, denominada a partir de então de fração SP, mostraram que esta fração trata-se de um polissacarídeo de baixa massa molar (3,88 kDa) formado por 98% de manose, 2% de glucose e com 15% de acetilação, o que corresponde a um grau de substituição (DS) de 0,66. As análises de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C mostraram que SP é estruturalmente semelhante à FP, diferindo em massa molar. A partir dos sinais obtidos, pode-se inferir que a

molécula de SP é constituída por uma manana linear β-(1→4)-ligada, com acetilações em C-2, C-3, C-2/C-3 e C-6 nas unidades de manose. No espectro de RMN de ^{13}C, não foi possível observar a presença de glucose, provavelmente devido à sua baixa razão molar (~ 2%). Os dados encontrados corroboram com a idéia de que a molécula é composta principalmente por manose com unidades de glucose e com um grau de acetilação menor do que FP (18,4%). Entretanto, a razão molar manose:glucose encontrada para SP (49:1), mostrou uma predominância das unidades de manose em relação à glucose quando comparadas a FP (24:1) (FIGURA 2).

Exemplo 3 - Ensaios de imunoestimulação de macrófagos peritoneais de camundongos

[100]. Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Experimentação e Ética Animal da instituição (Processo 23075.041511/2010-93).

[101]. Os procedimentos gerais para preparo de soluções e meio de cultura do cultivo animal estão descritos abaixo:

- procedimento de cultivo celular: todas as operações envolvendo o cultivo celular foram desenvolvidas em capela de fluxo laminar do tipo vertical II A1 equipada com filtro HEPA ("high efficiency particulate air") da Filterflux®;

- soluções: todas as soluções utilizadas para o cultivo celular foram preparadas com água ultra pura, obtida em aparelho Milli-Q da Millipore; solução salina tamponada (PBS): a solução estoque de salina tamponada composta por 40,5 mmol.L^{-1} de Na_2HPO_4, 680 mmol.L^{-1} de NaCl e 7,3 mmol.L^{-1} de KH_2PO_4, pH 7,4, foi esterilizada a 120°C e 1 atm, por 30

min e armazenada a 4°C. No momento do uso foi diluída cinco vezes com água MilliQ igualmente estéril;

- A esterilização das soluções termolábeis foi realizada por ultrafiltração positiva, sob pressão, utilizando-se membranas de acetato de celulose, com poros de 0,22 μm da Techno Plastic products AG® (TPP);
- meio de cultura: para a manutenção celular, foi utilizado o meio essencial mínimo de Eagle estéril (MEM) mantido a 4°C. Para o crescimento celular, o meio de Eagle foi enriquecido com soro fetal bovino estéril 5% (v/v);
- todos os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados foram submetidos à análise de variância ANOVA (fator único) e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (média±EPM) de no mínimo três experimentos em triplicatas. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p< 0,05$.

A. Preparo das soluções-teste utilizadas nos experimentos com culturas de macrófagos

[102]. A amostra despolimerizada enzimaticamente SP (10 $mg.mL^{-1}$) foi solubilizada em PBS contendo 50 $\mu g.mL^{-1}$ de polimixina B durante 4 h sob agitação a 37 °C (CUNHA, F. Q. *et al.* Phagocytosis and induction of nitric oxide sinthase in murine macrophages. **Immunology**, v. 79, p. 408-411, 1993). Essa solução foi esterilizada por ultrafiltração positiva, sob pressão, utilizando-se membranas de acetato de celulose, com poros de 0,22 μm. A amostra FP (20 $mg.mL^{-1}$) foi igualmente diluída em PBS e esterilizado por autoclavagem por 15 min a 121°C e 1 atm de pressão. Após a

autoclavagem, a solução de FP foi levada à câmara de fluxo e a ela adicionada solução estéril de polimixina B (50 $\mu g.mL^{-1}$ em PBS), até atingir a concentração de 10 $mg.mL^{-1}$ e mantida sob agitação por 2 h a 37°C, até completa solubilização. Em seguida, foi realizada a diluição das amostras em meio MEM estéril, originando as soluções-teste utilizadas nos tratamentos das culturas de macrófagos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

B. Obtenção de macrófagos

[103]. O modelo animal utilizado para obtenção das células foi camundongos swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com cerca de 60 dias de vida. Após a eutanásia dos animais, foi feita a assepsia da região abdominal com álcool etílico 70% (v/v) e exposição da membrana peritoneal. Utilizando seringas e agulhas estéreis, 10 mL de PBS pH 7,4, a 4°C foram inoculados na cavidade peritoneal. Após massagem vigorosa, as células do exsudato peritoneal foram aspiradas com seringa, transferidas para tubos plásticos estéreis e centrifugadas por 2500 rpm por 15 min a 4°C, em centrífuga refrigerada. As células sedimentadas foram lavadas com 10 mL de solução de hemólise aquosa [hidroximetil aminometano (TRIS) 0,017 M; cloreto de amônio (NH_4Cl) 0,144 M; pH 7,4] para eliminação das possíveis hemácias presentes. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em MEM estéril. A contagem celular foi feita em câmera de Neubauer, utilizando microscópio invertido e a avaliação da viabilidade celular foi realizada utilizando o método do azul de Tripan (PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for cell viability. In: KRUSE, Jr. P. F.; PATTERSON, Jr. M. K. **Tissue culture: methods and application**. New York: Academic Press, p.406-408, 1973).

[104]. A suspensão celular contendo os macrófagos (na concentração final de 5 x 10^5 cel/poço ou 1 x 10^6 cel/poço) foi aliquotada em placas de cultura estéreis, as quais foram incubadas, para aderência das células, por 1 h, a 37°C em atmosfera de 5% CO_2. A monocamada de células aderentes foi lavada duas vezes com PBS estéril, pH 7,4 a 37°C, para retirada de células suspensas, adicionou-se meio de cultura suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino juntamente com as soluções-teste conforme a metodologia descrita para cada tipo de experimento.

[105]. As alterações na morfologia dos macrófagos cultivados na presença das frações estudadas, nas concentrações de 10 e 160 $\mu g.mL^{-1}$, estão apresentadas na FIGURA 3. A partir das imagens obtidas foi possível observar que as amostras foram capazes de modificar a morfologia dos macrófagos. Estas células apresentaram morfologia descrita para macrófagos ativados, nos quais estes apresentam maior vacuolização e projeções citoplasmáticas.

C. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT

[106]. Para determinação da viabilidade celular utilizou-se o método descrito por Reilly e colaboradores (1998), do MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). As células metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em dimetil sulfóxido (DMSO) com uma coloração roxa característica (REILLY, T. P. *et al.* Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxilamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 55, p. 803-808, 1998).

[107]. Nesta avaliação os macrófagos peritoneais já aderidos foram lavados duas vezes com PBS estéril, pH 7,4 e a cada poço foi adicionado meio MEM contendo as amostras descritas, nas concentrações de 2,5, 10, 40, 160 e 640 $\mu g.mL^{-1}$. Além das soluções-teste, em cada experimento foram realizados os tratamentos controle, no qual as células foram cultivadas somente em meio de cultura por 24 e 48 h.

[108]. Em seguida, removeu-se o meio e adicionou-se 180 µL de meio contendo 20 µL de solução de MTT (previamente preparado em PBS na concentração de 5 $mg.mL^{-1}$), obtendo uma concentração final em MTT de 500 $\mu g.mL^{-1}$. As placas foram incubadas por 3 h, a 37°C em atmosfera de CO_2 a 5%. Após, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS e finalmente os cristais de formazan, que se formaram nas células viáveis, foram dissolvidos em 200 µL de DMSO. A absorbância foi medida a 550 nm, em espectrofotômetro, utilizando DMSO como branco.

[109]. Os resultados são mostrados na figura 6. No tempo de 24 e 48 h (FIGURAS 4 e 5), a fração FP, em todas as concentrações (40, 160 e 640 $\mu g.mL^{-1}$) apresentou diminuição na viabilidade celular dos macrófagos. A fração SP não promoveu diminuição significativa da viabilidade em nenhum dos tempos. Tal fenômeno demonstra uma característica citotóxica em macrófagos para FP e não citotóxica para SP nas concentrações testadas.

D. Dosagem das citocinas produzidas por cultura de macrófagos peritoneais

[110]. Numa primeira etapa, 1 x 10^6 macrófagos/poço (placa de 24 poços) foram incubados durante 24 h, a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2, na ausência (grupo controle negativo) ou na

presença de 1 mL das amostras anteriormente descritas, nas concentrações de 10, 40, 160 $\mu g.mL^{-1}$ ou de LPS (50 $\eta g.mL^{-1}$ - grupo controle positivo). Em seguida, cada sobrenadante foi centrifugado individualmente (2000 rpm, por 5 min), dividido em 4 alíquotas de 250 μL em microtubos tipo *eppendorf* estéreis identificados, e estocados a -80°C até posterior utilização. Cada microtubo foi destinado à dosagem de uma citocina (IL-1β, IL-6, IL-10 ou TNF-α), pelo menos em duplicata. Assim, com o mesmo sobrenadante, foi possível fazer a dosagem das quatro citocinas.

[111]. As dosagens foram determinadas pelo método ELISA, utilizando kits específicos para cada citocina. Os reagentes utilizados foram preparados de acordo com as especificações do fabricante.

[112]. Em dosagens de TNF-α (FIGURA 6), as células tratadas com FP resultaram em 246, 192 e 198% de aumento na produção desta citocina e as tratadas com SP apresentaram uma curva concentração-dependente, cujo aumento foi de 119, 125 e 136% respectivamente as concentrações testadas. A dosagem de IL-6 mostrou que somente as concentrações de 40 e 160 $\mu g.mL^{-1}$ da amostra FP (308 e 320%) foram capazes de atuar de modo significativo no aumento da produção desta interleucina (FIGURA 7). Mesmo não perfazendo uma diferença significativa, é importante notar um estímulo positivo para as concentrações de 10 $\mu g.mL^{-1}$ da amostra FP (238%) e SP (168, 130 e 223%, respectivamente). No que se refere à produção de IL-10 não foi observado incremento na produção desta citocina (FIGURA 8). Já o efeito causado por FP e SP nos níveis de IL-1β, foram de diminuição da produção, na percentagem 2355, 1254 e 4705%

para FP, e 1201, 1807 e 440% para SP, em relação ao controle negativo para todas as concentrações testadas (FIGURA 9). Desta forma sugere-se que as frações estimulem a produção de receptores solúveis de IL-1β.

E. Dosagem de óxido nítrico produzido por cultura de macrófagos peritoneais

[113]. Como o óxido nítrico possui um tempo de meia vida muito curto a determinação da produção deste radical por macrófagos é mensurado pela formação do nitrito (NO_2^-), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito foi realizada pelo método de Griess no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto (GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982). Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser quantificado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm (GREEN, L. C *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982; SUN, J. *et al.* Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, v. 3, p. 276-284, 2003).

[114]. Para a avaliação da produção de óxido nítrico os macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram plaqueados na densidade de 5 x 10^5 cel/poço, em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 48 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2, na

ausência (grupo controle negativo) ou na presença das amostras descritas. Como controle positivo da ativação da produção de óxido nítrico foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA) na concentração de 50 $\eta g.mL^{-1}$.

[115]. Após o tempo de incubação, 100 µL do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e adicionou-se 100 µL do reagente de Griess. Após incubação por 10 min a absorbância foi medida a 550 nm, em espectrofotômetro, utilizando como branco o meio MEM mais o reativo de Griess. As concentrações de nitrito foram determinadas utilizando uma curva padrão de $NaNO_2$ em concentrações de 10 µM a 100 µM. Os resultados foram expressos como quantidade de nitrito produzido em $\mu M/5x10^5$ células.

[116]. Foi estudada a capacidade das amostras frente ao ensaio de produção de óxido nítrico pelas células, uma vez que a via de produção do $NO^{\bullet}$ é essencial em alguns processos de defesa contra patógenos, inflamação (NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 319-326, 1987; NATHAN, C. F. Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2417-2423, 1997) e no processo da resposta imune (BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, p. 907–916, 2001).

[117]. As análises feitas em 48 h (FIGURA 10) de tratamento mostram que FP apresentou uma produção de $NO^{\bullet}$ significativa nas concentrações 10, 40, 160 e 640 $\mu g.mL^{-1}$, com percentuais de aumento em relação ao controle negativo de 294, 331, 350, 320%, respectivamente. SP apresentou efeito significativo na

concentração de NO•, para todas as concentrações testadas, onde as percentagens de produção de NO• em relação ao controle foram de 200, 200, 222, 212 e 260%. Cabe ressaltar que todas as moléculas foram tratadas com polimixina B, um antibiótico conhecido pelo efeito neutralizante da resposta envolvendo LPS bacteriano, desta forma, o efeito observado fica a cargo somente do polissacarídeo.

[118]. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que as amostras sozinhas foram capazes de estimular a síntese de NO•, mostrando que houve ativação dos macrófagos sem necessidade da presença de um segundo sinal.

Exemplo 4 - Ensaios de edema de pata em animais

[119]. Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos swiss (*Mus musculus*) machos (25-35 g), segundo protocolo aprovado pelo Comitê de Experimentação e Ética Animal da instituição (Processo 23075.041511/2010-93). Seis grupos experimentais (n=5 camundongos/grupo) foram tratados intraplantarmente com as amostras (FP e SP - obtidas conforme especificado nos exemplos 1 e 2, na concentração de 20 $\mu g.pata^{-1}$) ou dexametasona (1 $mg.kg^{-1}$ - controle positivo). Outros seis grupos (n=5 camundongos/grupo) foram tratados por via subcutânea (10 $mg.kg^{-1}$). Após 1h animais receberam uma injeção intraplantar esquerda traseira de 0,1 mL de uma solução de carragenina 300 $\mu g.pata^{-1}$ (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA) A pata contralateral (controle negativo) recebeu o mesmo volume de solução salina 0,9% (m/v) (WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenan-induced oedema in hind paw of the rats as an assay

for anti-inflamatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962).

[120]. Antes dos tratamentos, os animais foram submetidos a uma medida do volume de suas patas traseiras (direita e esquerda). Após as injeções, o volume das patas foi medido utilizando-se um micrômetro digital em intervalos regulares de 30, 60, 120 e 240 min. Os resultados foram expressos como a variação do volume entre as patas esquerdas e direitas e quantificada em milímetros (KASSUYA, C. A. *et al.* Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 369-76, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem de acordo com a fórmula (ZHANG, H; YE, L.; WANG, K. Structural characterization and anti-inflammatory activity of two water-soluble polysaccharides from *Bellamya purificata*. **Carbohydrate Polymers**. v. 81, p. 953–960, 2010):

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{diâmetro da pata controle} - \text{diâmetro da pata amostra})}{\text{diâmetro da pata controle}} \times 100$$

[121]. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA (fator único) e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (média±EPM) de no mínimo três experimentos em triplicatas. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p< 0,05$.

[122]. No ensaio de edema de pata, a ação farmacológica de FP e SP foi observada a partir do tempo de 30 min. Os gráficos demonstram que a prevenção da formação do edema em

injeção intraplantar de forma única (20 μg pata^{-1}) teve os resultados significativos para as amostras FP e SP. Em FP, os tempos significativos foram em 60, 120 e 240 min com inibições de 46, 28 e 33%, respectivamente, em relação ao mesmo tempo do controle negativo. Da mesma forma, o tratamento com dexametasona também impediu a formação de edema no mesmo intervalo de tempo, com inibições de 29, 31 e 37%, respectivamente. A fração SP apresentou significância em todos os tempos de ensaio, com 48, 41 e 51% de inibição, respectivamente. (FIGURA 11).

[123]. Em termos percentuais de inibição a fração FP, apresentou um perfil idêntico ao anti-inflamatório de referência, a dexametasona, enquanto a fração SP apresentou um perfil anti-inflamatório superior aos polissacarídeos nativos, em que o perfil de inibição de edema foi superior à dexametasona.

[124]. No experimento de avaliação sistêmica com a mesma concentração, injetado na região dorsal dos animais, após 2 h, FP e SP apresentaram respectivamente 32,7 e 65,7%, de inibição contra 39% da dexametasona (1 mg.kg^{-1}). Assim, FP mostrou-se significativamente igual à dexametasona e SP mostrou-se significativamente superior à dexametasona, onde a variação percentual de SP em relação à molécula de referência foi cerca de 26% (FIGURA 12).

[125]. Ambas as frações FP e SP apresentaram resultados positivos no ensaio intraplantar e ensaio de injeção sistêmica das amostras, com destaque para SP. Devido ao pequeno tamanho (~4 kDa), SP pode difundir-se melhor nos tecidos e chegar à corrente sanguínea, sendo distribuída pelo organismo, bem como realizar uma ação local. Esta fração, em ensaio *in vitro*, de cultivo

de macrófagos não mostrou-se citotóxica, sendo portanto uma boa candidata a futuros ensaios no sentido da criação de um medicamento, devido à característica única da fração.

[126]. FP, a fração de maior massa molar obtida de *A. barbadensis* (1230 kDa). Nos ensaios em cultivo celular foi a que apresentou maior diminuição da viabilidade celular, para as concentrações testadas, embora tenha sido efetiva na inibição de edema no tratamento intraplantar e apresentando efeito sistêmico.

[127]. Dentro desta perspectiva, sugere-se que fatores como a massa molar, a conformação molecular e o grau de acetilação das frações sejam determinantes na ação anti-inflamatória.

REIVINDICAÇÕES

1. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO DE *ALOE* COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E PROCESSO PARA OBTENÇÃO DO MESMO, caracterizado por compreender a utilização de *Aloe barbadensis* Miller na obtenção de polissacarídeos de baixa massa molar com propriedades anti-inflamatórias.

2. PROCESSO para produção do despolimerizado enzimático de *Aloe*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

i. Solubilização da fração polissacarídica de *Aloe* em solução tampão;

ii. Adição da enzima;

iii. Incubação por 6-10 h entre 40-50°C;

iv. Inativação da enzima entre 80-100°C, por 10-15 min;

v. Filtração;

vi. Liofilização;

vii. Cromatografia de exclusão por tamanho;

viii. Liofilização

3. PROCESSO para produção do despolimerizado enzimático de *Aloe*, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela enzima ser uma endo-1→3(4)-β-D-glucanase.

4. PROCESSO para produção do despolimerizado enzimático de *Aloe*, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela filtração ser realizada em membrana de 0,45 μm.

5. PROCESSO para produção do despolimerizado enzimático de *Aloe barbadensis* Miller, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela cromatografia de exclusão ser realizada em fase estacionária com limite de exclusão de 3 kDa.

6. PROCESSO para produção do despolimerizado enzimático de *Aloe barbadensis* Miller, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela cromatografia de exclusão ter água purificada como fase móvel.

7. PROCESSO para produção do despolimerizado enzimático de *Aloe barbadensis* Miller, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela fração polissacarídica de *Aloe* compreender as seguintes etapas:

i. Coleta e lavagem das folhas;

ii. Remoção da polpa das folhas após remoção da casca;

iii. Secagem ou liofilização;

iv. Moagem (<300 mesh);

v. Solubilização do material em água purificada;

vi. Centrifugação/filtração;

vii. Tratamento do sobrenadante/filtrado com solvente orgânico polar por no mínimo 12 horas;

viii. Centrifugação/filtração;

ix. Secagem ou liofilização;

x. Solubilização em água purificada, em concentração de 0,1-10 $g.L^{-1}$ (p/v);

xi. Centrifugação/filtração;

xii. Diálise do sobrenadante gerado;

xiii. Secagem ou liofilização.

8. PROCESSO para produção do despolimerizado enzimático de *Aloe barbadensis* Miller, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo solvente orgânico polar ser etanol, metanol, isopropanol, *n*-propanol ou acetona.

9. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, caracterizado por ser obtenível por um processo definido em qualquer uma das reivindicações 2-8.

10. PROCESSO para produção do despolimerizado enzimático de *Aloe* caracterizado por compreender a despolimerização enzimática de uma fração polissacarídica (>10 kDa) utilizando uma enzima endo-1→3(4)-β-D-glucanase seguida de cromatografia de exclusão por tamanho com limite de exclusão de 3 kDa gerando um polissacarídeo de baixa massa molar (<5 kDa).

11. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO, caracterizado por ser obtido de folhas de *Aloe Barbadensis* Miller.

12. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, de acordo com as reivindicações 1 e 11, caracterizado por ser uma manana β-(1→4)-ligada.

13. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela manana conter entre 90-99,9% de manose e entre 0,1-5% de glucose.

14. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por um grau de acetilação entre 10-20%.

15. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por grau de substituição por grupos acetila de 0,5-1.

16. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por uma massa molar <5 kDa.

17. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, de acordo com as reivindicações 12-16, caracterizado por ser um agente anti-inflamatório.

18. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, caracterizado pelo uso no tratamento de doenças inflamatórias.

19. USO do despolimerizado enzimático de *Aloe* no tratamento de doenças inflamatórias, de acordo com reivindicação 18, caracterizado por essas doenças serem inflamações na pele, mucosas ou sistêmicas.

20. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, caracterizado pelo uso no tratamento de processos inflamatórios.

21. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, caracterizado pelo uso no tratamento de sintomas decorrentes de doenças inflamatórias ou processos inflamatórios.

22. DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO obtido de *Aloe*, caracterizado pela utilização em manufatura de medicamentos para tratamento de doenças inflamatórias.

23. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA OU DERMOCOSMÉTICA caracterizado por compreender um despolimerizado enzimático de *Aloe* como ingrediente ativo de forma isolada ou em conjunto de outros ativos ou excipientes farmaceuticamente ou dermatologicamente aceitáveis.

24. MÉTODO para tratamento de pacientes com doenças inflamatórias caracterizado por compreender a administração de quantidade terapeuticamente eficiente do despolimerizado enzimático de *Aloe*.

25. MÉTODO para tratamento de pacientes com doenças inflamatórias, de acordo com reivindicação 24, caracterizado pela administração isolada do despolimerizado enzimático de *Aloe* ou em associação com outros medicamentos para promover o efeito anti-inflamatório.

FIGURA 1

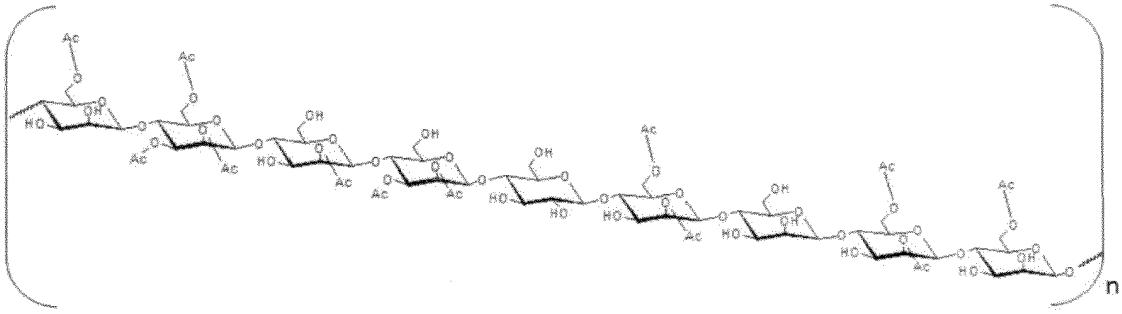


FIGURA 2

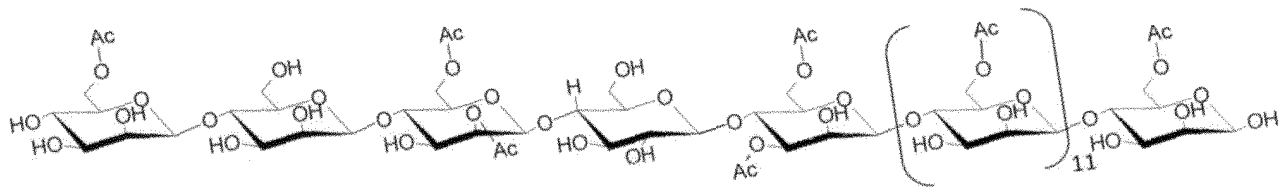


FIGURA 3

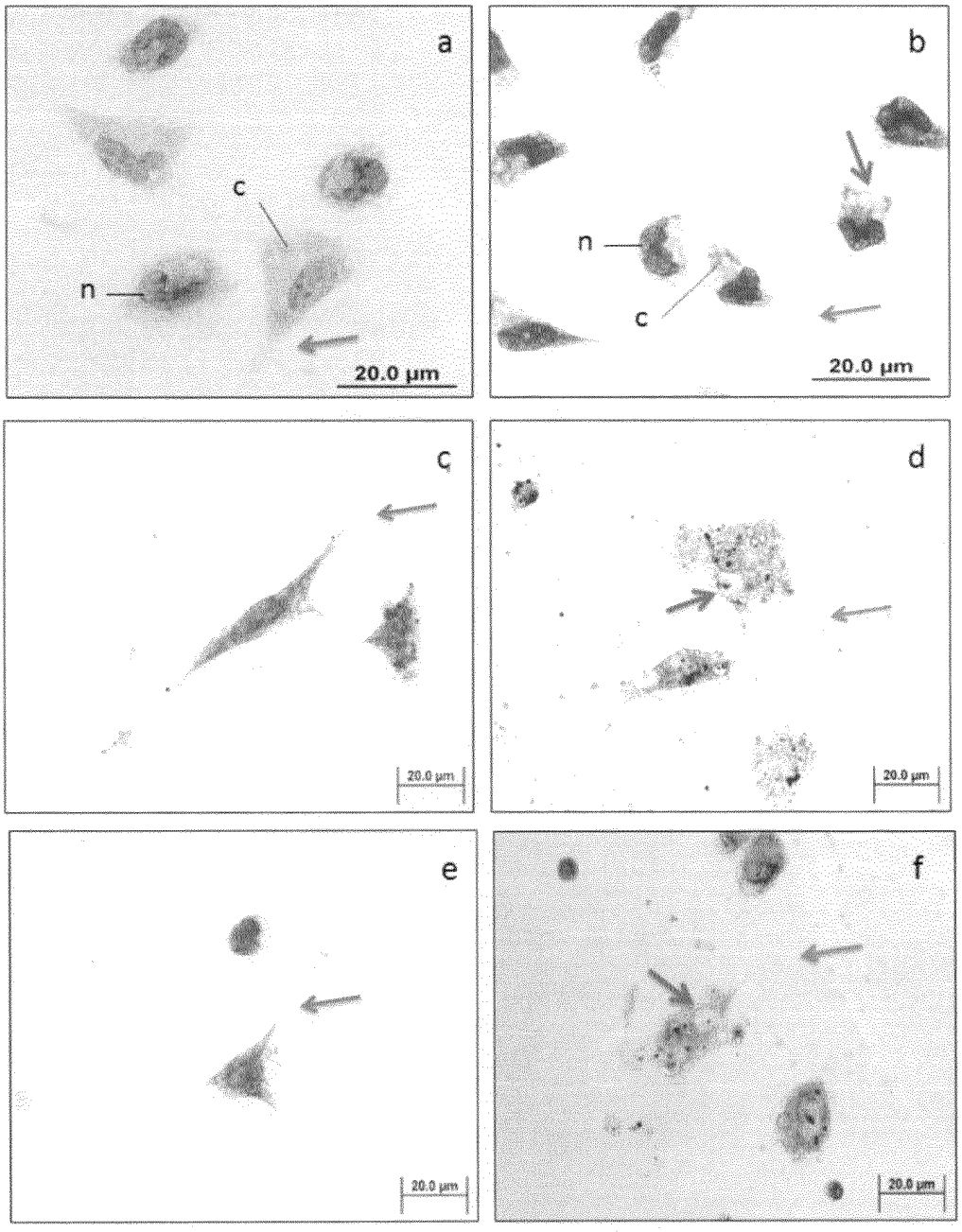


FIGURA 4

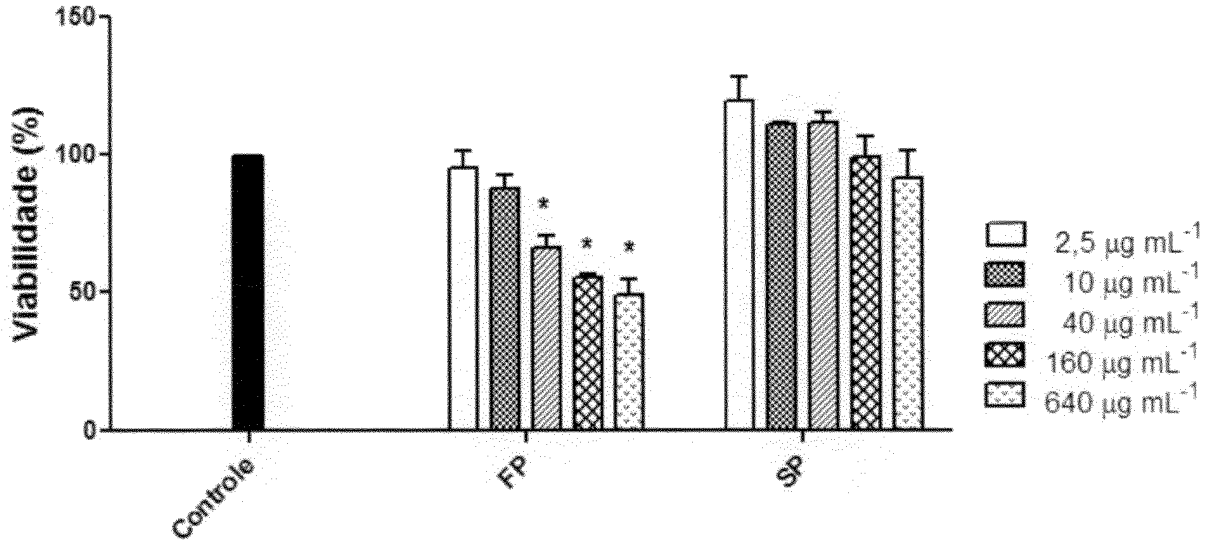

150
100
50
0
Viabilidade (%)
*
*
*
Controle
FP
SP
2,5 µg mL-1
10 µg mL-1
40 µg mL-1
160 µg mL-1
640 µg mL-1

FIGURA 5

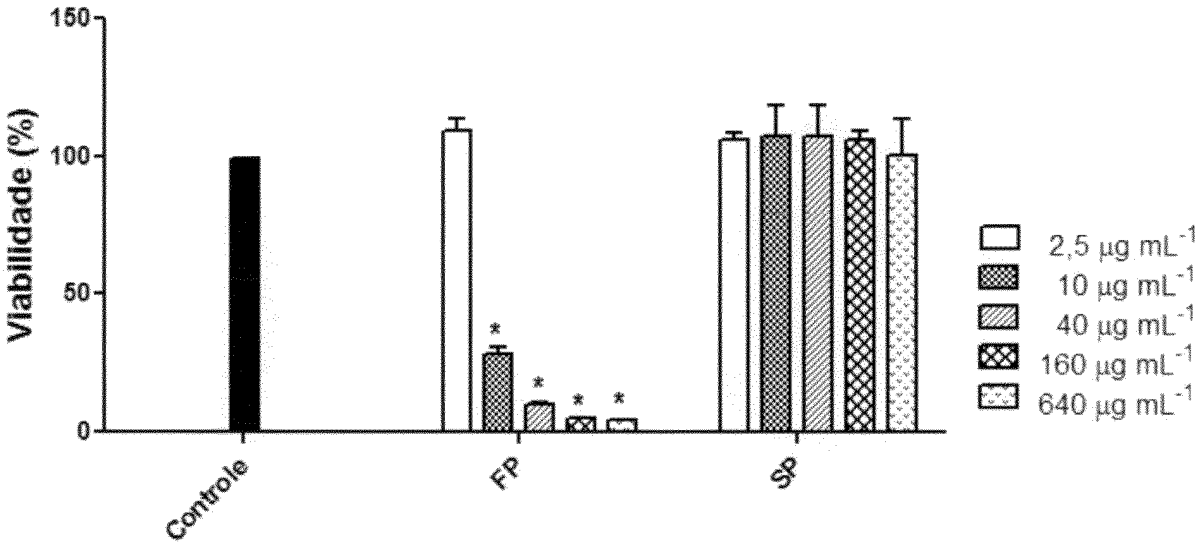

150
100
50
0
Viabilidade (%)
Controle
FP
SP
*
*
*
*
2,5 µg mL-1
10 µg mL-1
40 µg mL-1
160 µg mL-1
640 µg mL-1

FIGURA 6

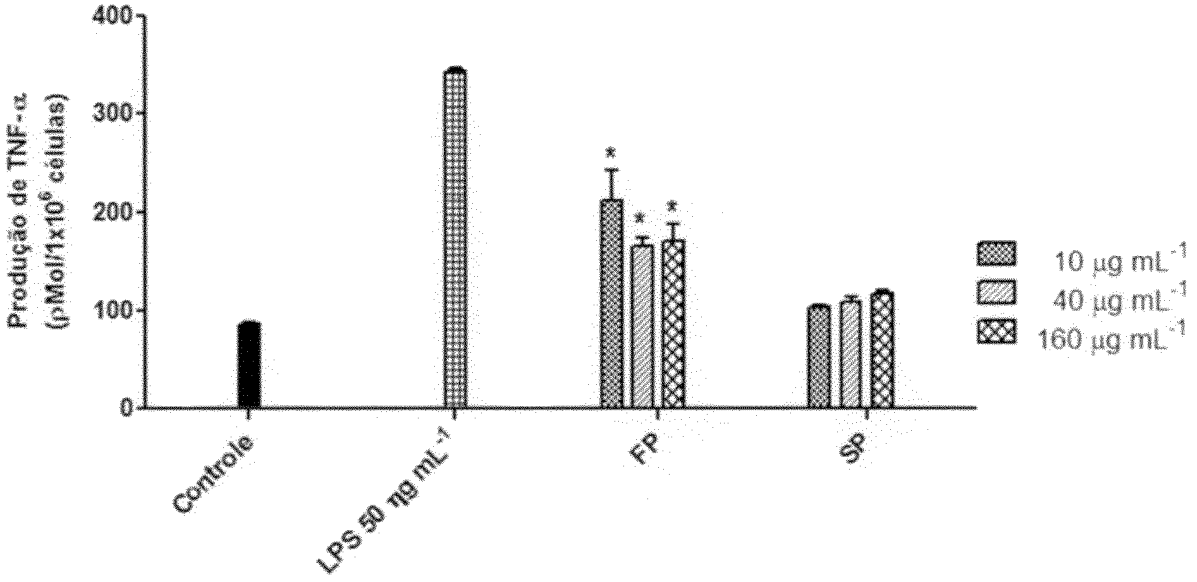

Produção de TNF-α
(pMol/1x10^6 células)
400
300
200
100
0
Controle
LPS 50 ng mL-1
FP
SP
10 µg mL-1
40 µg mL-1
160 µg mL-1
*
*
*

FIGURA 7

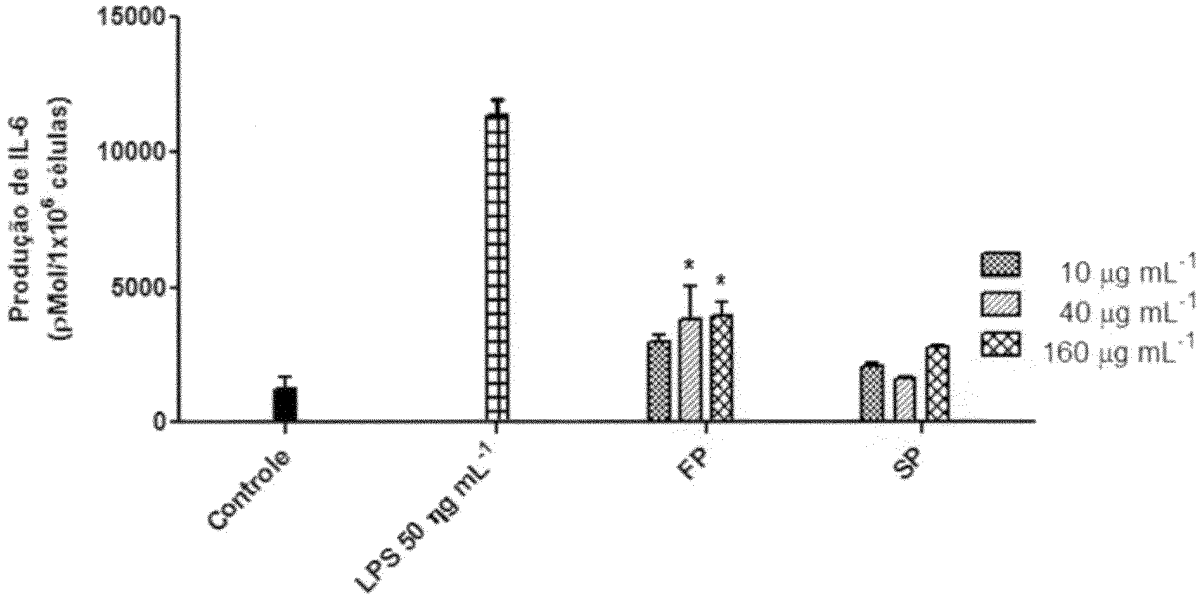

15000
10000
5000
0
Produção de IL-6
(pMol/1x10^6 células)
*
*
10 µg mL-1
40 µg mL-1
160 µg mL-1
Controle
LPS 50 ng mL-1
FP
SP

FIGURA 8

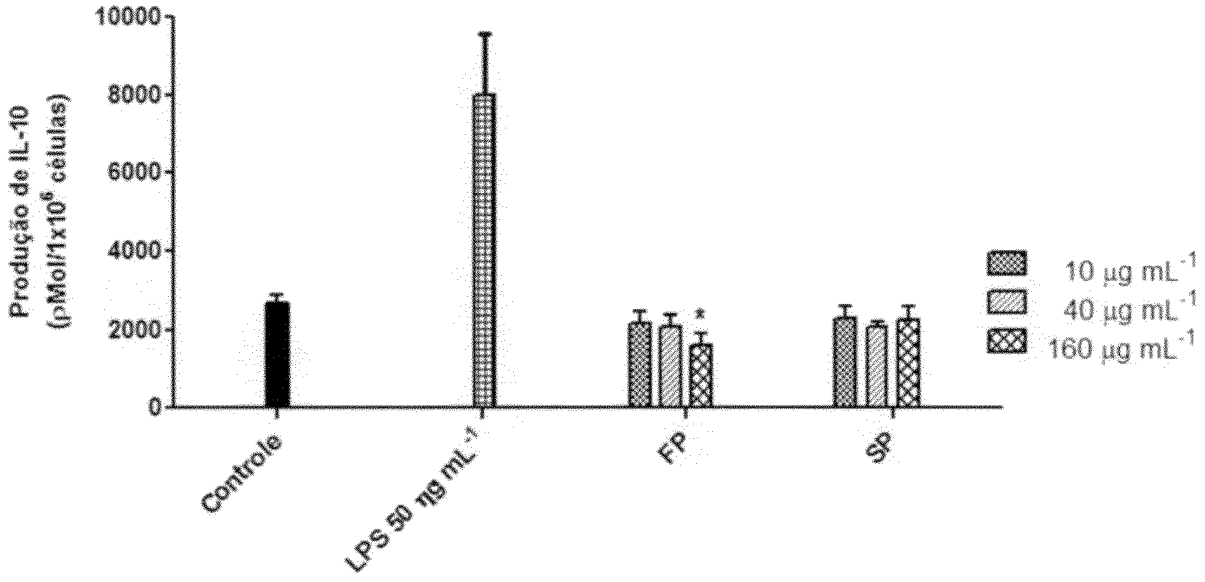

Produção de IL-10
(pMol/1x10^6 células)
10000
8000
6000
4000
2000
0
Controle
LPS 50 ng mL-1
FP
SP
*
10 µg mL-1
40 µg mL-1
160 µg mL-1

FIGURA 9

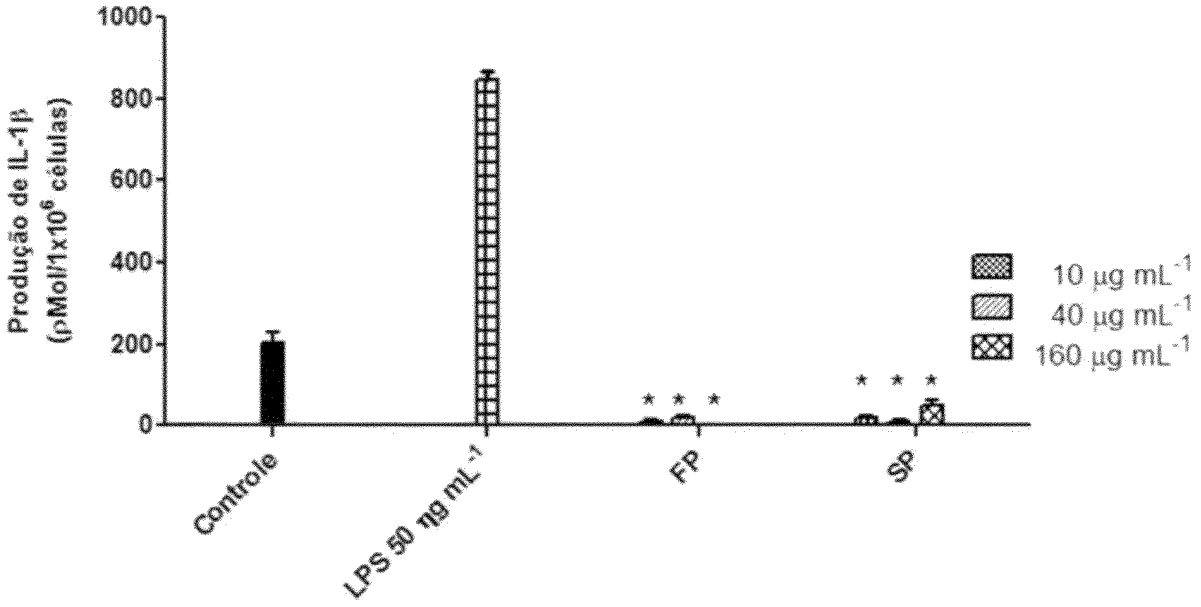

1000
800
600
400
200
0
Produção de IL-1β
(pMol/1x10^6 células)
Controle
LPS 50 ng mL^-1
FP
SP
10 µg mL^-1
40 µg mL^-1
160 µg mL^-1

FIGURA 10

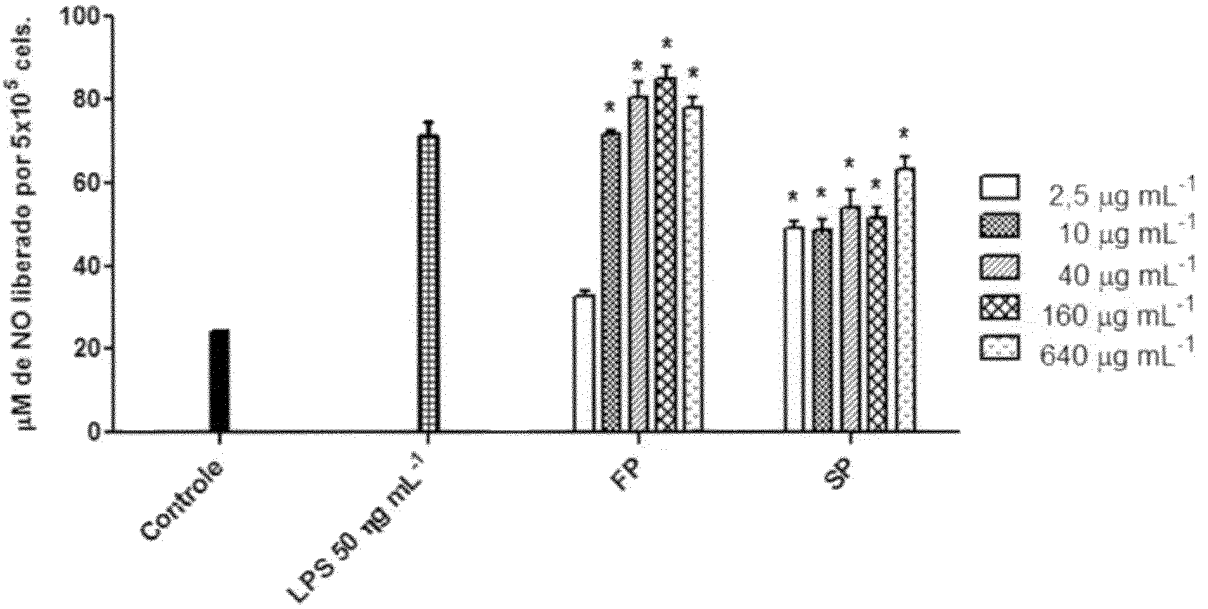

µM de NO liberado por 5x10^5 cels.
100
80
60
40
20
0
Controle
LPS 50 ng mL^{-1}
FP
SP
2,5 µg mL^{-1}
10 µg mL^{-1}
40 µg mL^{-1}
160 µg mL^{-1}
640 µg mL^{-1}

FIGURA 11

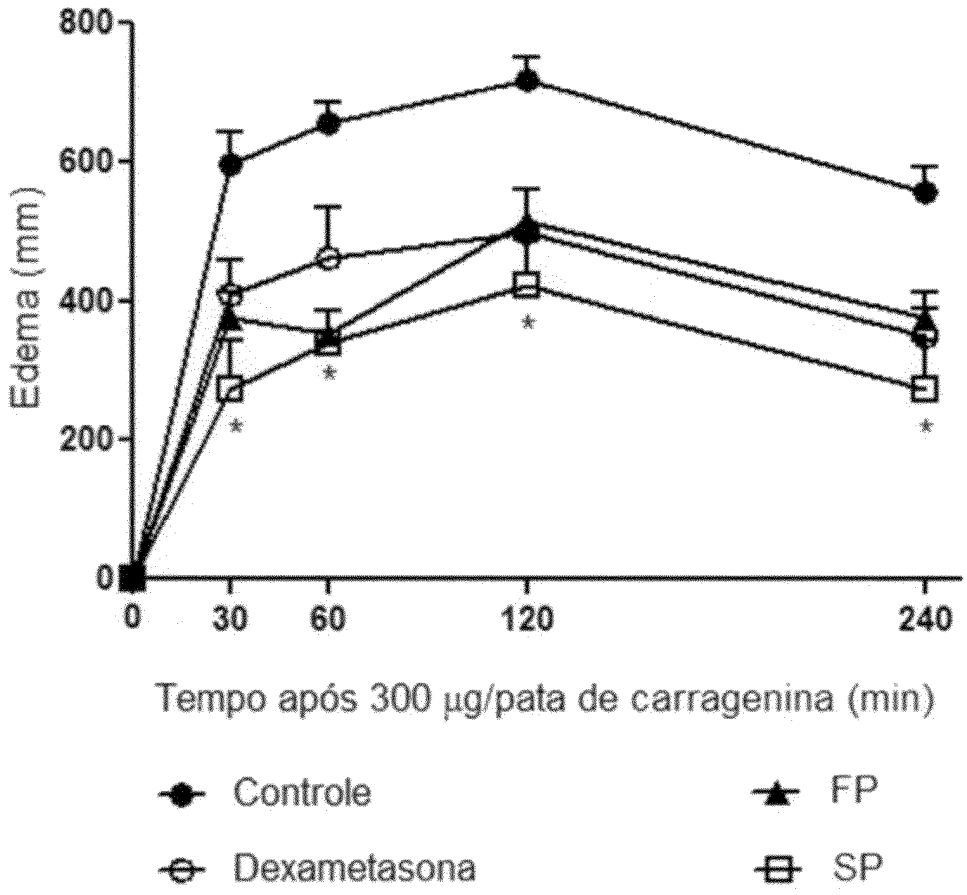
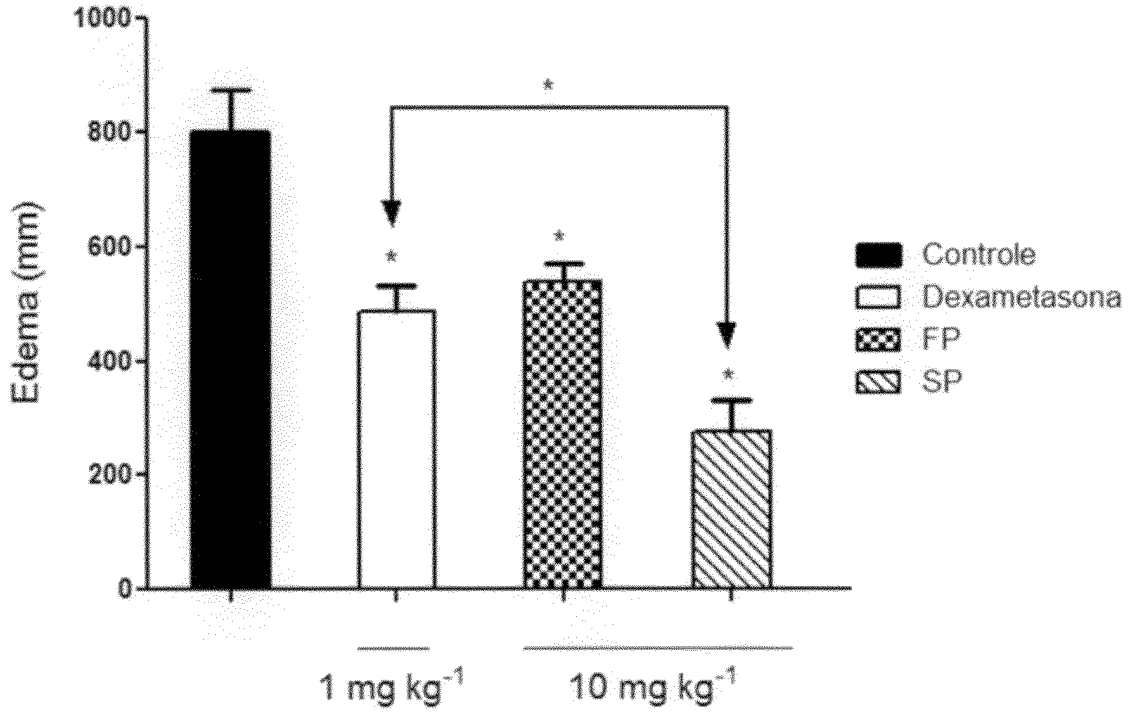

800
600
400
200
0
Edema (mm)
0
30
60
120
240
*
*
*
*
Tempo após 300 µg/pata de carragenina (min)
Controle
Dexametasona
FP
SP

FIGURA 12


1000
800
600
400
200
0
Edema (mm)
*
*
*
*
Controle
Dexametasona
FP
SP
1 mg kg-1
10 mg kg-1

RESUMO

DESPOLIMERIZADO ENZIMÁTICO DE *ALOE* COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E PROCESSO PARA OBTENÇÃO DO MESMO

A presente invenção trata de um despolimerizado enzimático de *Aloe* como agente anti-inflamatório e processo para obtenção do mesmo. A invenção relata o uso de um polissacarídeo de baixa massa molar, obtido a partir de despolimerização enzimática da fração polissacarídica de *Aloe barbadensis* Miller como agente anti-inflamatório, utilizado de forma isolada ou em conjunto de outros ativos, em composições farmacêuticas ou dermocosméticas. Especificamente trata dos processos de produção deste polímero ativo e seu uso em métodos e composições para tratamento de doenças inflamatórias, processos inflamatórios e sintomas decorrentes.