UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Avaliação da atividade imunomoduladora das pectinas *in natura* e modificadas obtidas de goiabas

Janayra Maris Teixeira

Tese para obtenção de título de DOUTORA

Orientador: Prof. Tit. João Roberto Oliveira do Nascimento.

São Paulo

2020

JANAYRA MARIS TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DAS PECTINAS *IN NATURA* E MODIFICADAS OBTIDAS DE GOIABAS

Versão original

Tese apresentada ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências dos Alimentos.

Área de concentração: Bromatologia

Orientador: Prof. Tit. João Roberto Oliveira do Nascimento.

SÃO PAULO- SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T266a

Teixeira, Janayra Maris
Avaliação da atividade imunomoduladora das pectinas in natura e modificadas obtidas de goiabas / Janayra Maris Teixeira. - São Paulo, 2020.
107 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. polissacarídeos. 2. goiaba. 3. citocinas inflamatórias. 4. imunomodulação. 5. macrófagos. I. T. II. Nascimento, João Roberto Oliveira do, orientador.

Janayra Maris Teixeira

Avaliação da atividade imunomoduladora das pectinas *in natura* e modificadas obtidas de goiabas

Comissão Julgadora da

Tese para obtenção do título de Doutora

Prof. Tit. João Roberto Oliveira do Nascimento

Orientador/Presidente

_____

1º Examinador

_____

2º Examinador

_____

3º Examinador

_____

4º Examinador

São Paulo,_____, de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e todos aqueles que permitiram que a vida chegasse até a mim e me deram a oportunidade de concretizar esse sonho.

À Ludmila Facundo Cunico por restaurar em mim o amor e a fé.

A todos os familiares e amigos que me ajudaram, ampararam, me acolheram e me inspiraram nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao professor João Roberto pela orientação desse projeto, pela confiança, oportunidade e por me ajudar nas horas difíceis. Agradeço por todo aprendizado.

Aos professores do Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos em especial à professora Beatriz Cordenusi Lysenko e ao professor João Paulo Fabi, por toda contribuição neste projeto e pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha evolução acadêmica e pessoal.

Ao Dr. José Emílio Bettiol Neto, pesquisador científico do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Centro APTA de Frutas, que forneceu a matéria prima para este estudo.

À Tânia Shiga pelas contribuições a este trabalho, pelas ajudas técnicas, ensinamentos e conversas.

À Luciene Lauer, Aline Oliveira, Lúcia Justino e Elias Araújo pelo suporte técnico e agradáveis conversas.

Aos técnicos Tatiana, Laila, Ivan e Alexandre pelo auxílio e suporte.

À Ana Cláudia, Marcelo, Victor e Mayra, que me ajudaram imensamente desde sempre neste projeto.

À Natiely Sales do Instituto de Ciências Biomédicas pela ajuda, por compartilhar comigo ensinamentos, pelo acolhimento e boa companhia.

À professora Dalva Lúcia Araújo de Faria do Instituto de Química (IQ- USP) por nos disponibilizar o uso do equipamento de infravermelho e ao Otávio Mendes Gil, pelo auxílio e disponibilidade.

À Simone Nascimento pela ajuda e disponibilidade técnica.

Aos grandes amigos, grandes pesquisadores e principalmente grandes seres humanos, que contribuíram tanto nessa jornada acadêmica e pessoal. Obrigada sempre pelas ajudas nos experimentos, nas discussões acadêmicas, pelo ombro amigo e por transmitirem sempre amor, carinho e cuidados. Levarei vocês sempre

comigo. Sabrina, Virginia, Mayra, Raíssa, Laís, Jacqueline, Manuela, Rodrigo, Thiago, Isabel, Renier, Lina, Gabriela, Fernanda, Lucas, Layane, Thiecla, Jéssica, Sara e Alessandra.

Às minhas amadas primas Michele e Bruna por todo amor, apoio e amparo em todos os momentos da minha jornada pessoal e profissional. Em especial à Bruna por toda sua ajuda para a finalização desta tese.

Aos meus queridos amigos Felipe Takano e Felipe Nunes pela assistência, disponibilidade e pelas divertidas conversas.

À professora Maria Isabel de Almeida da Faculdade de Educação (FEUSP) que me trouxe inspiração nessa jornada, não só através do ensino com amor, mas pelo grande ser humano que pude conhecer.

Aos amigos Sabrina, Silvania, Virgínia, Edison e Antônio por todo amparo e amor. Vocês iluminaram a minha jornada.

Aos meus tios em especial Regina, Catarina e Pedro e à minha prima Beatriz pelo amor e acolhimento. Obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa desde a graduação. Muito obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que viabilizou esse trabalho por meio do auxílio 2013/07914-8 concedido ao Centro de Pesquisa em Alimentos (FoRC), da linha de Fomento Programas de Inovação Tecnológica/ Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID)- Chamada de Propostas 2013.

A todos os meus professores ao longo da minha jornada pelos ensinamentos, confiança e apoio que contribuíram para que um dia esse sonho fosse concretizado.

A todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

TEIXEIRA, J. M. **Avaliação da atividade imunomoduladora das pectinas *in natura* e modificadas obtidas de goiabas.** 2020. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

As pectinas presentes nas frutas, assim como sua versão modificada, estão entre as biomoléculas mais promissoras no campo da imunomodulação. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial imunomodulador de pectinas obtidas de goiabas verdes e maduras, bem como suas versões modificadas. As goiabas cv. Tailandesas foram avaliadas ao longo do amadurecimento, sendo acompanhadas as alterações da cor da polpa e casca, firmeza, produção de etileno e respiração, perda de massa e o teor de açúcares solúveis. Após a caracterização dos frutos, foram extraídas as pectinas e estas foram caracterizadas quanto ao conteúdo monossacarídico, peso molecular, presença de oligossacarídeos e grau de esterificação. As pectinas *in natura* de goiaba madura e verde, bem como a versão modificada desta última apresentaram frações de alto e baixo peso molecular, alta proporção de ácido galacturônico e alto teor de esterificação. Por outro lado, as pectinas modificadas derivadas de goiaba madura apresentaram maior desesterificação, com perda de frações de menor peso molecular, menor proporção de ácido galacturônico e baixo teor de esterificação. As pectinas foram incubadas com células THP-1 e RAW 264.7, e apesar da alta viabilidade celular e ausência de efeito citotóxico, resultou em expressiva produção de espécies reativas de oxigênio. De modo geral, as pectinas *in natura* de goiaba verde e madura, e pectina modificada de goiaba verde promoveram estímulo da produção de citocinas diversas, em especial inflamatórias, como IL-1β, IL-12, CCL5, CXCL10 e CXCL9, para células THP-1 e IL-10 (anti-inflamatória), TNF-α e MCP-1, demonstrando seu potencial imunomodulador, já para células RAW 264.7 as pectinas estimularam a produção de IL-10, TNF-α e MCP-1, demonstrando seu potencial imunomodulador. A pectina modificada derivada da goiaba madura não promoveu a indução significativa de nenhuma citocina. Estes resultados sugerem que as pectinas obtidas a partir de goiabas têm potencial imunomodulador e devem ser estudadas em outros modelos celulares e / ou em concentrações mais altas e modelos *in vivo*, para que esses benefícios possam realmente ser comprovados.

Palavras-Chave: polissacarídeos, goiaba, pectina modificada, citocinas inflamatórias, imunomodulação, macrófagos.

ABSTRACT

TEIXEIRA, J. M. **Evaluation of immunomodulatory activity of non-modified and modified pectins from guava fruit.** 2020. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The pectin present in fruits and their modified version are the most promising biomolecules in the immunomodulatory field. This study aimed to evaluate the immunomodulatory potential of pectins obtained from unripe and ripe guavas (*Psidium guajava* L.) cv. Thailandesa as well as their modified versions. The guavas were characterized during ripening regarding cell wall solubilization, sugar content, firmness, mass loss and ethylene production rate and respiration during 10th following harvest. After fruit characterization, pectins were extracted and characterized for monosaccharide content, molecular weight, presence of oligosaccharides and degree of esterification. Pectins from unripe and ripe guava as well as the modified versions of pectins had high and low molecular weight fractions, a high proportion of galacturonic acid and high esterification content. On the other hand, modified pectins derived from ripe guava showed higher de-esterification, with loss of lower molecular weight fractions, a lower proportion of galacturonic acid and low esterification content. The pectins were incubated with THP-1 and RAW 264.7 cells, and despite the high cell viability and absence of cytotoxic effect, the treatment resulted in the expressive production of reactive oxygen species. In general, pectins from ripe and unripe guava and modified pectin from unripe guava stimulated the production of diverse cytokines, especially inflammatory cytokines, such as IL-1β, IL 12, CCL5, CXCL10, and CXCL9, for THP-1, while IL-10 (anti-inflammatory), TNF-α and MCP-1 were stimulated in RAW 264.7 cells, demonstrating their immunomodulatory potential. Modified pectin derived from ripe guava did not promote any significant induction of the cytokines investigated. These results suggest that pectins obtained from guavas have immunomodulatory potential and deserve a more in-depth investigation using other cellular models and/or use of higher concentrations and *in vivo* models tests so their immunomodulatory benefits can be proven.

Keywords: polysaccharides, guava, modified pectin, inflammatory cytokines, immunomodulation, macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações da cromaticidade da casca e polpa de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....42

Figura 2. Parâmetros físico-químicos para o acompanhamento da maturação de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa ao longo de 10 dias após a colheita do fruto (dpc).....44

Figura 3. Composição de açúcares solúveis de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. verdes e maduras.....45

Figura 4. Esquema simplificado das etapas empregadas para a obtenção de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa verdes e maduras e suas versões modificadas.....46

Figura 5. Composição monossacarídica de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava L.*) cv. Tailandesa. determinada por cromatografia de troca iônica.....48

Figura 6. Cromatogramas por exclusão de tamanho de diferentes amostras de pectina de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa separadas em colunas PL-aquagel-OH (60, 50, 40 e 30; 300 mm × 7,5 mm).....50

Figura 7. Perfil cromatográfico de pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa quanto à presença de monossacarídeos e oligossacarídeos nas diferentes amostras, determinado por cromatografia de troca iônica com coluna CarboPac PA10 (2 mm × 250 mm).....51

Figura 8. Espectroscopia de infravermelho, pela técnica de Refletância Total Atenuada (ATR) com transformada de Fourier ATR-FTIR e com detector DTGS de diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....52

Figura 9. Percentual do grau de esterificação de diferentes pectinas extraídas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....53

Figura 10. Concentração de endotoxinas em diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa por meio do ensaio do lisado de amebócitos de límulo (LAL).....54

Figura 11. Viabilidade de células THP-1 por MTT quando incubadas com diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....55

Figura 12. Relação entre viabilidade celular por MTT e tempo de incubação de diferentes pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa incubadas em células THP-1.....56

Figura 13. Relação viabilidade de células THP-1 por MTT e concentração da amostra de diferentes pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....57

Figura 14. Avaliação da proliferação e morte de células THP-1 incubadas com diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....58

Figura 15. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células THP- 1 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....59

Figura 16. Relação entre produção de ERO e tempo de incubação de células THP-1 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa...60

Figura 17. Relação entre produção de ERO e tempo de incubação de células THP-1 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....61

Figura 18. Viabilidade de células RAW 264.7 por MTT quando incubadas com diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....62

Figura 19. Relação entre viabilidade celular por MTT e tempo de incubação de diferentes pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa incubadas em células RAW 264.7.....63

Figura 20. Relação viabilidade de células RAW 264.7 por MTT e concentração da amostra de diferentes pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....64

Figura 21. Avaliação da proliferação e morte de células RAW 264.7 incubadas com diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....65

Figura 22. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células RAW 264.7 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....66

Figura 23. Relação entre produção de ERO e tempo de incubação de células RAW 264.7 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....67

Figura 24. Relação entre produção de ERO em células RAW 264.7 e concentração de diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa.....68

Figura 25. Interleucinas produzidas por células THP-1.....69

Figura 26. Quimiocinas produzidas por células THP-1.....70

Figura 27. Citocinas produzidas por células RAW 264.7.....71

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: micrograma

µL: microlitros

Ara: Arabinose

AT: amido total

ATCC- American Type Culture Collection

ATR- Refletância Total Atenuada

B: Branco (meio de cultura- sem tratamento)

CCL2: Ligante de Quimiocina-2

CCL5: Ligante de Quimiocina-5

cv: Cultivar

CXC10: Ligante de Quimiocina 10

CXCL8: Ligante de Quimiocina 8

CXCL9: Ligante de Quimiocina 9

Da: Dalton- Unidade de massa atômica

DMEM: meio de cultura para células RAW

DPC: Dias pós-colheita

EqAG: Equivalente de Ácido Gálico

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

EU: unidade equivalente- concentração de endotoxina

FOS: frutooligossacarídeo

FSA- Fração solúvel em água

Fuc: Fucose

g: gramas

Gal: Galactose

GalA: Ácido galacturonico

GE: Grau de esterificação

Glc: Glicose

GlcA: Ácido glicurônico

GP: grau de polimerização

h: horas

HCl: Ácido clorídrico

IFN-γ: Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-1β: Interleucina 1β

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

KDa: quilodalton- unidade de massa atômica

LAL: Lisado de Amebócitos de Limulus

LDH: lactato desidrogenase

LPS: Lipopolissacarídeo

LPS: Lipopolissacarídeo

M: Pectina de goiaba madura

Man: Manose

MCP-1: proteína-1 quimioatraente de monócitos

mg: miligrama

min: Minutos

MM- Pectina modificada de goiaba madura

mm: milímentros

MOS: maltooligossacarídeo

MRB: Modificadores de Resposta Biológica

MTT: 3- (4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium

N: Newton- medida de força

NaOH: Hidróxido de sódio

Nm: nanômetros

ºC: Graus Celsius

ºh: ângulo hue

PAMPs: Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato

PmB: Polimixina B

PNA: polissacarídeo não amido

PVP: Polivinilpirrolidona triplamente lavado

RANTES: Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

RAW 264.7- macrógagos murinos

RPMI: meio de cultura para células THP-1

T: Triton X-100

TFA: Ácido trifluoroacético

TGA: Ácido tioglicólico

THP-1: Célula monocítica humana

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral alfa

V: Pectina de goiaba verde

v: volume

VM: Pectina modificada de goiaba verde

Xyl: Xilose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1POLISSACARÍDEOS EM ALIMENTOS 19
1.2CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E IMUNOMODULADORAS DA PECTINA 22
1.3 A GOIABA 25
2 OBJETIVOS 28
2.1 OBJETIVO GERAL 28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28
3 MATERIAL E MÉTODOS 29
3.1 FRUTOS 29
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS IN NATURA 29
3.2.1 Cor 29
3.2.2 Firmeza 29
3.2.3 Perda de massa 30
3.2.4 Produção de etileno e taxa respiratória 30
3.2.5 Determinação de amido total 30
3.2.6 Açúcares solúveis 31
3.3 OBTENÇÃO DAS PECTINAS 31
3.3.1 Remoção compostos fenólicos por ácido tioglicólico 32
3.3.2 Extração da fração solúvel em água (FSA) 32
3.3.3 Remoção compostos fenólicos por PVP 33
3.3.4 Obtenção da pectina modificada 33
3.4 DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E PROTEÍNAS 33
3.4.1 Teste colorimétrico para identificação das antocianidinas 34
3.4.2. Teste de Folin-Ciocalteau 34
3.4.3 Ensaio de proteínas de Bradford 34
3.5 REMOÇÃO DE LPS POR POLIMIXINA B 34
3.6 DETECÇÃO POR MEIO DO ENSAIO DO LISADO DE AMEBÓCITOS DE LÍMOLO 35
3.7 COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES NEUTROS E ÁCIDOS URÔNICOS 36
3.8 DETERMINAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS 36
3.9 FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO 37

3.10 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR) 37
3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS 38
3.11.1 Cultivo celular 38
3.11.2 Incubação 38
3.11.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT 39
3.11.4 Ensaio de proliferação celular por azul de tripan 39
3.11.5 Detecção de citotoxidade por ensaio de desidrogenase lática 40
3.11.6 Ensaio de espécies reativas de oxigênio 40
3.11.7 Ensaio de citocinas e quimiocinas 41
4 RESULTADOS 43
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E FISIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE GOIABAS 43
4.2 PRESENÇA DE PROTEÍNAS E COMPOSTOS FENÓLICOS 48
4.3 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E TAMANHO MOLECULAR 48
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR INFRAVERMELHO 51
4.4 DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS 53
4.5 CÉLULAS THP-1 54
4.5.1 Viabilidade Celular por MTT 54
4.5.2 Proliferação e morte celular 57
4.5.3 Espécies reativas de oxigênio 58
4.6 CÉLULAS RAW 264.7 62
4.6.1 Viabilidade Celular por MTT 62
4.6.2 Proliferação e morte celular 64
4.6.7 Espécies reativas de oxigênio 65
4.6.7 Citocinas 68
5 DISCUSSÃO 72
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTOS 72
5.2. PROTEÍNAS, PIGMENTOS E COMPOSTOS FENÓLICOS 73
5.3 COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES, OLIGOSSACARÍDEOS E TAMANHO MOLECULAR 74
5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR INFRAVERMELHO 77
5.5 ENDOTOXINAS 78
5.6 VIABILIDADE CELULAR POR MTT, AZUL DE TRIPAN E CITOTOXIDADE POR LDH 79

5.7 ESPÉCIES REATIVAS 80
5.8 CITOCINAS.....81
6 CONCLUSÃO 87
5 REFERÊNCIAS 88

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune é constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas, cuja finalidade é defender o organismo de quaisquer substâncias exógenas e patogênicas, mantendo a homeostase orgânica. Dentre as frentes de defesas, a imunidade inata constitui a linha primordial contra infecções, atuando rapidamente contra injúrias, danos teciduais e a estímulos prévios. É composta de elementos físicos, químicos e biológicos, dentre os quais se destacam os macrófagos (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012;NETEA; QUINTIN; VAN DER MEER, 2011).

Os macrófagos são células de defesa derivadas dos monócitos, oriundos da medula óssea. Ao migrarem para os tecidos, os monócitos amadurecem e se diferenciam em macrófagos, onde desempenham papel importante na modulação da resposta inflamatória. Essas células são responsáveis pela produção e secreção de citocinas (interleucinas, interferons, fator de necrose tumoral e quimiocinas) que promovem comunicação célula-célula, atuando como ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo, promovendo ações pro ou anti-inflamatórias (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012; MANTOVANI,2007).

Essas importantes células de defesa sinalizam a entrada de patógenos, através da interação de suas estruturas de superfície com diferentes tipos de receptores (ROMANI et al., 2003; LICHTMAN; ABBAS, 2007). Em geral, os macrófagos estão envolvidos em atividade microbicida e antitumoral, oferecendo sua função estimuladora e acessória. Sua atividade é de extrema importância não apenas no início da resposta inflamatória, mas também em seu desfecho (SCHULENBURG et al., 2004; ZHANG; MOSSER, 2008; DENARDO; RUFFELL, 2019).

Diversos componentes alimentares interagem com células imunológicas presentes no intestino, inclusive com os macrófagos, induzindo a produção de fatores e mediadores distintos, que regulam as respostas imunes, criando um ambiente propício à imunomodulação (HACHIMURA; TOTSUKA; HOSONO, 2018; GAO et al., 2018; WICHERS, 2009).

Tais componentes, sejam eles naturais ou sintéticos, podem interagir com as células de defesa e atuar como modificadores de resposta biológica (MRB), ou seja, podem estimular ou suprimir a resposta imune, promovendo o aumento da atividade celular, produção de radicais livres e citocinas, contribuindo para a manutenção da saúde (DEVASAGAYAM; SAINIS, 2002; STEKOL'NIKOV et al., 2018; SLIN et al., 2019; SHUKLA, 2014).

Alguns polissacarídeos são considerados modificadores de resposta biológica (MRB) exógenos e, portanto, podem agir nas células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Eles se ligam aos receptores de reconhecimento de padrões como o CD14, Toll-like receptor 4 (TLR-4), receptor scavenger, receptor de complemento 3 (CR3), Dectina-1 ou receptor de manose, que são os mesmos receptores que reconhecem os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), comumente encontrados na superfície de micro-organismos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; GORDON, 2002).

A interação com os receptores celulares promove a ativação da resposta imune inata, gerando ativação, proliferação e opsonização celular, além de estimular diversos fatores que desencadeiam a ativação cascata inflamatória (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; GORDON, 2002).

Na inflamação temos a ativação e/ou a potencialização do sistema complemento, modulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e interferons, além da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico (NO). Quando esse estado inflamatório precisa ser suprimido, há posteriormente a produção de componentes proteicos anti-inflamatórios, como as citocinas (IL-4, IL-10, IL-13) (KOUAKOU et al., 2013; GHILDYAL et al., 2010; XIE; SCHEPETKIN; QUINN, 2007; GUAN et al., 2011).

As citocinas são bastante complexas. Além de atuarem na ativação imunológica local e sistêmica, na inflamação e na comunicação celular, elas também têm relação com diversas doenças e inclusive podem ter efeitos neurais, afetando o bem-estar geral do indivíduo, que se dá pela imunomodulação dos sistemas serotoninérgicos, principalmente quando ocorre uma mediação por Th1, ou seja, num ambiente inflamatório (CAMPOS-

RODRÍGUEZ et al., 2013; LOWRY et al., 2007; COLLINS; BERCIK, 2013; EL AIDY; DINAN; CRYAN, 2014)

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas ou íons derivados do oxigênio, altamente instáveis, geradas durante o estresse oxidativo. Dentre elas podemos citar o óxido nítrico (NO), hidroxila (OH), o radical superóxido ($O2^-$) e radical peroxila (ROO). São geradas a partir de diversas fontes, incluindo a cadeia respiratória mitocondrial, por ativação enzimática e por processos celulares (BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010; LENAZ, 2001).

A geração de ERO é controlada por diversas proteínas, incluindo as mitocondriais. Estão envolvidas na manutenção da homeostase, inclusive macrofágica e na eliminação de patógenos, principalmente em ambiente inflamatório. Entretanto, em grandes quantidades, podem causar apoptose, necrose e até mesmo danos no DNA (AMARAL DA SILVA; CALDERON GONÇALVES, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; ISHIKAWA et al., 2008; MITTLER, 2017; TAN et al., 2016).

O consumo de alimentos vegetais com tais características pode ser uma estratégia para nutrir e ao mesmo tempo moldar a resposta imune do indivíduo. Além disso, podem ser importantes auxiliares terapêuticos no desenvolvimento de novas vacinas e no tratamento de doenças e alergias (HOTALING et al., 2015).

Notadamente, os carboidratos complexos, presentes nos alimentos, têm sido cada vez mais associados à melhora da resposta imunológica, visto que, seu consumo pode impactar na função imune inata e na mediação celular e promover efeito antioxidante, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiparasitário, anticoagulante e até mesmo antitumoral (KANG; SEO; PARK, 2015; LEUNG et al., 2006; WASSER, 2002; HO et al., 2015; YIN et al., 2019).

Pesquisas mostram que o potencial imunomodulador de distintas fontes de pectinas vegetais pode estar atrelado diretamente à suas características específicas, tais como composição e estrutura (AMORIM et al., 2016; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; LEUNG et al., 2006; GORDON, 2002).

1.1 POLISSACARÍDEOS EM ALIMENTOS

Os polissacarídeos constituem uma classe dos carboidratos, que perfazem um grupo abundante e diversificado da natureza e constituem uma

parte importante da dieta humana, fornecendo cerca de 45- 65% da calorias totais em dietas normoglicídicas (LEHNINGER; 2018; INSTITUTO DE MEDICINA, 2016).

Quimicamente, os carboidratos, cuja fórmula geral empírica é $(CH_2O)n$, mas podem conter nitrogênio, fósforo ou enxofre, são classificados como poli-hidroxialdeídos ou cetonas, ou compostos derivados. A classificação química primária dada principalmente pelo tamanho molecular (grau de polimerização [GP]), composição de monómeros de açúcar e tipo de ligação (α ou β). (KNUDSEN, et al, 2016; CUMMINGS; STEPHEN, 2007; LIVESEY, 2003; LEHNINGER; 2018).

Os polissacarídeos, ao lado dos açúcares, também conhecidos como açúcares simples ou açúcares solúveis, e dos oligossacarídeos, formam os três grandes grupos dos carboidratos. Os açúcares incluem os monossacarídeos, que podem ser subdivididos em açúcares neutros, como a glicose, xilose, fucose, ramnose arabinose, galactose e manose, e ácidos urônicos, ou açúcares ácidos, como o ácido galacturônico e ácido glicurônico, e os dissacarídeos, que são formados pela união de dois monossacarídeos, sendo a sacarose, lactose e a maltose, os mais conhecidos (FAO, 1998; LIVESEY, 2003; LEHNINGER; 2018).

Os oligossacarídeos, por sua vez, são representados por cadeias curtas constituídas de monossacarídeos (entre 3-9) unidos por ligações glicosídicas. Em contraste, os polissacarídeos, ou glicanos, são formados pela união de centenas ou milhares de monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas (α e β), com distintos comprimentos de cadeia e grau de ramificação, com grau de polimerização maior que 10 e massa molecular média a alta, acima de 20.000 g/mol (FAO, 1998; LIVESEY, 2003; LEHNINGER; 2018). No entanto, alguns dos parâmetros como GP, podem variar conforme o autor (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

Os polissacarídeos podem ser classificados com base nas suas propriedades físico-químicas como viscosidade, capacidade de retenção de água, ligação de moléculas orgânicas e inorgânicas, e solubilidade, mas também quanto à sua digestibilidade e fermentação (CUMMINGS, STEPHEN, 2007; KUMAR et al., 2012).

Dentre as possíveis classificações dos polissacarídeos, pode ser destacada aquela que divide esses carboidratos em amiláceos e não amiláceos (PNAs). O primeiro grupo compreende apenas o amido, polímero composto inteiramente de monômeros de glicose, unidos por ligações α- glicosídicas, enquanto o segundo grupo, com predominância de ligações β- glicosídicas, abrange diversos polissacarídeos, tais como: celulose, hemicelulose, gomas, mucilagens, quitina e pectina, dentre outros (CUMMINGS; STEPHEN, 2007; CUMMINGS; MANN, 2017).

Os polissacarídeos amiláceos, unidos por ligações α- glicosídicas, são degradados em monômeros por ação de enzimas endógenas (ZIJLSTRA et al., 2012; KNUDSEN et al., 2016) e, portanto, são passíveis de digestão. Já aqueles polissacarídeos com ligações β não são digerídos pelas enzimas endógenas e, dessa forma, podem ser totalmente ou parcialmente degradados no organismo humano caso sofram ação enzimática microbiana (FLINT et al., 2012; SCOTT et al., 2013; CUMMINGS; STEPHEN, 2007).

Os PNAs também conhecidos como fibras dietéticas ou fibras alimentares, apresentam estruturas químicas e propriedades fisiológicas distintas. Os PNAs solúveis, como as pectinas, podem formar dispersões e/ou soluções, e em razão de sua alta capacidade de hidratação tem a capacidade de aumentar a viscosidade do bolo alimentar pela formação de géis, sendo facilmente fermentados pela microbiota do intestino grosso (WONG et al., 2017; BUTTRISS, 2008; JONES, 2013).

Quando fermentados, produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), promovendo fonte de energia para utilização e benefícios, atrelados à diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, gastrointestinais e câncer (FULLER et al., 2016; ELIA; CUMMINGS, 2007).

Já os PNAs insolúveis em água, ou fibras insolúveis, tal como a celulose, podem permanecer intactos durante todo o trânsito pelo trato gastrointestinal e tem como principal efeito o aumento do bolo fecal, já que há um aumento na absorção de água e redução o tempo do trânsito de intestinal, além disso, são pouco fermentáveis (WONG et al., 2017).

O consumo de PNAs vegetais trazem diversos benefícios à saúde humana, dentre os quais podem ser destacados a modulação da secreção de hormônios, efeitos associados a marcadores metabólicos e inflamatórios,

diminuição dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de várias doenças, dentre as quais estão a obesidade, o diabetes, o câncer e as cardiovasculares (LATTIMER; HAUB, 2010; WEICKERT; PFEIFFER, 2008).

Pesquisas mostram que o potencial imunomodulador de distintas fontes de pectinas vegetais pode estar atrelado diretamente à suas características específicas, tais como composição e estrutura (AMORIM et al., 2016; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; LEUNG et al., 2006; GORDON, 2002).

1.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E IMUNOMODULADORAS DA PECTINA

A pectina é um dos principais polissacarídeos contidos na parede celular e nas lamelas médias das células vegetais. É abundante em leguminosas, frutas cítricas e em resíduos agroindustriais e, provavelmente, possui a estrutura macromolecular mais complexa encontrada na natureza (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; WILLATS, 2001).

Nos vegetais a pectina desempenha papel multifuncional, pois é importante no transporte de íons e influencia propriedades da parede celular, dentre as quais a porosidade, carga superficial, pH e equilíbrio iônico, além de ter papel na adesão célula-célula, na estrutura da parede, na expansão celular, na hidratação das sementes e na sinalização e defesa (VORAGEN et al., 2009; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; YAPO; KOFII, 2013).

Pectina é um termo genérico que abrange as protopectinas, os ácidos pectínicos e os ácidos pécticos. As primeiras são encontradas abundantemente em frutos verdes cuja característica principal é a reduzida solubilidade em água e o alto grau de esterificação, mas que no decorrer do amadurecimento sofrem hidrólise pela ação das enzimas poligalacturonases (PG) e pectinametilesterases (PME) originando, respectivamente, o ácido pectínico, solúvel em água e metoxilado, e o ácido péctico, substância solúvel em água com baixo grau de esterificação (TARRAHI; HAJNAJARI; BADII, 2008; UENOJO; PASTORE, 2007).

A pectina é composta por diferentes monossacarídeos, dentre eles os açúcares neutros, que podem estar dispostos na cadeia principal e nas cadeias laterais, e os ácidos urônicos, sobretudo o ácido galacturônico (GalA), componente majoritário, que podem estar combinados com sais de cálcio ou

com ésteres de metil, por exemplo (WASCHECK, 2008; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; CANTERI et al., 2012; VORAGEN et al., 2009; CAFFALL; MOHNEN 2009; CUMMINGS; STEPHEN, 2007).

Na literatura são descritos muitos elementos estruturais das pectinas, que podem variar em estrutura, tamanho e grau de ramificação conforme a espécie da planta, ou tecido. De modo geral, as pectinas não possuem uma massa molecular definida, podendo apresentar grande variação em razão das diferentes composições dos açúcares, do comprimento de cadeia dos vários domínios e dos diferentes tipos de ligações (UENOJO; PASTORE, 2007; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; VORAGEN et al., 2009; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN; 2006).

As pectinas podem ser subdivididas em duas classes em função do seu grau de esterificação ou metoxilação que é uma medida proporcional de grupos metoxílicos (-CH3) ou de grupos carboxílicos (-COO) esterificados, em relação ao total de unidades de ácido galacturônico (GAVA; DA SILVA; FRIAS, 2009; FIB, 2014).

As pectinas de alta metoxilação (ATM) apresentam esterificação superior a 50%, enquanto as de baixa metoxilação (BTM) tem grau de esterificação inferior a 50%. Os graus de metoxilação são utilizados principalmente na indústria, já que influencia fortemente as propriedades funcionais das pectinas, tais como solubilidade, capacidade e condições de gelificação (FIB, 2014; LIONETTI; CERVONE; BELLINCAMPI, 2012; WOLF; MOUILLE; PELLOUX, 2009).

A pectina é considerada um aditivo alimentício seguro, cujo uso no país é reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e não possui ingestão diária aceitável (IDA), ou seja, não existem limitações quanto ao seu uso, visto que é parte da dieta habitual, pois ocorre naturalmente nos vegetais (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN; 2006; ANVISA, 2010).

O consumo médio diário de pectina em uma dieta ocidental é de aproximadamente 4 a 5 g, sendo que seu teor e composição dependem tanto da fonte vegetal como do estádio de desenvolvimento ou amadurecimento, no caso de um fruto. Em geral, seu teor varia de 10 a 30% do peso fresco, e a maior concentração se encontra na casca dos frutos (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; SRIAMORNSAK, 2003).

Atualmente, há um crescimento de utilização de pectinas pela indústria, também em razão de seus efeitos benéficos para a saúde humana, que envolvem a sensação de saciedade e o estímulo à resposta imunológica (KERMANI et al., 2015; YULIARTI et al., 2015; CAFFALL; MOHNEN, 2009; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; YAPO; KOFII, 2013).

Quando submetidas a processos de aquecimento e alteração de pH há uma alteração substancial da estrutura das pectinas, resultando em polissacarídeos distintos dos obtidos da fruta *in natura,* denominadas pectinas modificadas. Tais modificações provocam a quebra das cadeias poliméricas e, portanto, promovem novas interações intermoleculares, alterando a composição, o tamanho das cadeias, o grau de esterificação e sua ação biológica (YOO et al., 2006; YOO et al., 2003).

A pectina modificada é um polissacarídeo rico em ácido galacturônico que basicamente sofre alterações de pH e temperatura. Essa modificação resulta em alterações estruturais de tamanho e grau de esterificação. Há formação de um complexo absorvível pelo trato gastrointestinal, diferentemente da sua forma natural, devido à quebra de sua cadeia principal em fragmentos menores, originando sequências de açúcares neutros com um baixo grau de ramificação (CANTERI et al., 2012; MAXWELL et al., 2012; LECLERE; VAN CUTSEM; MICHIELS, 2013).

Posteriormente, seus benefícios foram evidenciados, principalmente daquelas originadas das frutas cítricas, que ainda são as mais estudadas (VENZON et al., 2015; AMORIM et al., 2016; LECLERE et al., 2016), como moduladora do sistema imune, sendo empregada na terapia experimental, como adjuvante na inibição da metástase, migração de células tumorais e, portanto, no desenvolvimento tumoral (LIU et al., 2008; GUESS et al., 2003; ZHAO et al., 2008; GLINSKY; RAZ, 2009).

Nesse sentido, a maioria dos estudos com pectinas modificadas são realizados com células cancerígenas, devido ao seu potencial citotóxico. Seus mecanismos não estão totalmente elucidados, principalmente em células não tumorais, mas que são importantes para a imunidade, como é o caso dos macrófagos (VENZON et al., 2015; AMORIM et al., 2016; LECLERE et al., 2016).

A modificação é um processo que também ocorre naturalmente nos frutos, em decorrência ao amadurecimento. Durante esse processo ocorre uma alteração estrutural da parede celular, da metilestruturação, solubilização e despolimerização

com consequentemente alteração da composição dos polissacarídeos, açúcares solúveis e de outros componentes associados, como pigmentos, proteínas e compostos fenólicos (MANRIQUE; LAJOLO, 2002; UENOJO; PASTORE, 2007; GOULAO; OLIVEIRA, 2008; JACOMINO; BRON, 2004). Essa modificação fisiológica, tal como a modificação química, pode promover efeitos biológicos benéficos ativando o sistema imunológico (DO PRADO et al., 2017).

Desse modo, assim como a modificação química por pH e temperatura, o amadurecimento pode modificar os parâmetros estruturais e moleculares, e portanto, afetar diretamente seus efeitos biológicos (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN; 2006; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; LÖFGREN; WALKENSTROM; HERMANSSON, 2002; SILA et al., 2008).

1.3 A GOIABA

A goiaba é o fruto da goiabeira (*Psidium guajava L.*), espécie da família Myrtaceae, originária das Américas, bastante resistente e de fácil acesso. É um fruto de excelente aceitação, amplamente consumido não só *in natura*, mas também na forma de sucos, polpas, sorvetes, geleia, doces entre outros. Além do sabor, esse fruto destaca-se por seu alto valor nutricional, pois é rico em vitaminas C e do complexo B, carotenoides (β-caroteno, licopeno), polifenóis, minerais e fibras (AMALIYA; RISDIANA; VAN DER VELDEN, 2018; BARBALHO et al., 2012; JIMÉNEZ- ESCRIG et al., 2001).

A goiaba é apreciada em diversos países e no Brasil é produzida em larga escala, com maior produção de goiabas vermelhas, sendo que uma grande parcela é destinada ao mercado europeu e à indústria, embora haja um aumento significativo do consumo da fruta fresca nos grandes centros urbanos (VIEIRA et al., 2014; SPILLER et al., 2018).

O fruto da goiabeira é altamente perecível devido ao seu intenso metabolismo, no entanto, no mercado já existem cultivares como a goiaba da cultivar Tailandesa, que oferece vantagens ao consumidor, à indústria e à exportação, já que possui maior tempo natural de conservação, está disponível praticamente o ano inteiro, é maior em relação a outras variedades, tem sabor doce e muito agradável e possui menor quantidade de sementes. Ao mesmo tempo, apresenta menor custo de mão de obra, além de ser mais resistente a

doenças e sofrer menos ataques de insetos (SPILLER et al., 2018; SOUZA 2008).

Independente da variedade de goiabeira, principalmente suas folhas e também os frutos são conhecidos pelas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antidiarreicas, analgésica, antimutagênicas, por reduzir os níveis de glicose e pressão arterial e aumentar os níveis de HDL- colesterol (BURANA-OSOTA et al., 2010; DENNY et al., 2013; JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2001).

Em geral, tais propriedades estão associadas à ação de polifenóis, β-caroteno, licopeno e da vitamina C (HOLDERNESS et al., 2011; RAO; AGARWAL, 2000; ORDÓÑEZ-SANTOS; VÁZQUEZ- RIASCOS, 2010). Entretanto, a literatura tem evidenciado cada vez mais o potencial de macromoléculas, em especial, os carboidratos complexos. (HOLDERNESS et al., 2011; RAO; AGARWAL, 2000; ORDÓÑEZ-SANTOS; VÁZQUEZ- RIASCOS, 2010; SELANI, et al., 2016).

Apesar da goiaba ser rica em componentes potencialmente imunomoduladores, como as pectinas, investigações neste aspecto são limitadas. No entanto, os resultados obtidos pelos estudos de Burana-Osot e colaboradores (2010) e de Bontempo et al. (2012) são aparentemente promissores e reforçam a necessidade de se investigar mais profundamente com outras abordagens metodológicas.

Dessa forma, é interessante também investigar os efeitos imunomoduladores de sua pectina quando modificada, uma vez que o processo pode resultar em um polissacarídeo com potencial imunomodulador distinto daquele presente no fruto fresco. Da mesma forma, o processo de amadurecimento implica em modificação das pectinas, incluindo sua solubilização e alteração do tamanho da cadeia, que podem refletir no potencial limunomodulador.

Assim, é possível formular a hipótese de que as pectinas obtidas de goiabas, bem como aquelas resultantes de diferentes modificações, químicas ou fisiológicas, produzam polissacarídeos com atividade imunomoduladora. Diante da relevância tanto biológica quanto econômica e social desse fruto, fica claro a necessidade de se estudar esses alimentos e suas biomoléculas derivadas, já

que podem beneficiar o consumidor, atrelando saúde e nutrição como mais um passo na imunoterapia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial imunomodulador de pectinas *in natura* e modificadas provenientes de goiabas (*Psidium guajava L.)* cv. Tailandesa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as alterações físico-químicas dos frutos verdes e maduros quanto à cor, firmeza, síntese de etileno, taxa respiratória, perda de massa e teor de açúcares solúveis;
- Extrair e purificar pectinas de goiabas nos estádios verde e maduro;
- Submeter as pectinas extraídas das goiabas a processos de modificação;
- Caracterizar as pectinas de goiaba quanto aos tipos e teores de monossacarídeos, peso molecular, presença de oligossacarídeos, grau de esterificação e presença de outros compostos como fenólicos e proteínas;
- Testar diferentes concentrações de pectinas em ensaio de viabilidade celular e proliferação celular, bem como citotoxidade em células THP-1 e RAW 264.7;
- Verificar a produção de interleucinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio em células THP-1 e RAW 264.7 tratadas com pectinas in natura e modificadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FRUTOS

Goiabas (*Psidium guajava* L.) da cultivar Tailandesa, provenientes do município de Jundiaí- SP foram coletadas manualmente e selecionadas de forma homogênea, em estádio de maturação verde, polpa firme sem manchas ou injúrias.

A fim de caracterizar os frutos quanto ao estádio de maturação, os frutos foram acondicionados em sala escura, com temperatura ambiente controlada (22 ± 1 ºC) e foram avaliados, diariamente, durante dez dias, quanto aos seguintes parâmetros: cor, firmeza, perda de massa, produção de etileno e taxa respiratória, avaliada pela produção de CO_2.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS IN NATURA

3.2.1 Cor

Para avaliar a cor foi seguido o método descrito por Fabi et al. (2007), utilizando colorímetro CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japão). A cor foi expressa em relação ao valor de matiz, conforme o ângulo de tonalidade, calculado pela fórmula: °H=tan1(b/a), onde “a” e “b” são valores fornecidos pelo aparelho, considerando o plano de cores descrito pelo método Hunter. Para a realização das análises foram realizadas seis leituras, três da polpa e três da casca, por fruta diariamente, em lados opostos de sua região equatorial.

3.2.2 Firmeza

A firmeza foi determinada por meio da análise com texturômetro digital TA. XT2i (Stable Micro Systems®, Texture Exponent 32) com ponteira de 6 mm. Para avaliar a firmeza da fruta (não houve remoção da casca) foram feitas três leituras no ápice da região equatorial, considerando o corte perpendicular a essa região. E três leituras da polpa, tomadas aleatoriamente, nas regiões do mesocarpo e da placenta, foram feitas utilizando a região equatorial da fruta. Os resultados foram expressos em Newton (N).

3.2.3 Perda de massa

As goiabas foram pesadas diariamente por dez dias, em balança digital semi analítica, para avaliar a perda de massa. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.2.4 Produção de etileno e taxa respiratória

As goiabas foram colocadas em frascos de vidro (capacidade para 2,5 L) hermeticamente fechados, com septo de silicone nas tampas. Os frascos foram fechados por 1 h para equilíbrio da atmosfera interna e posterior coleta das amostras. Foram acondicionados quatro frutos por frasco em triplicata. Para a estimativa de produção de etileno e CO_2 foram coletadas amostras da atmosfera interna em triplicata com seringa de 1 mL.

As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás da Hewlett-Packard modelo GC-6890, equipado com detector por ionização de chama (FID) para etileno e detector de condutividade térmica para CO_2 com coluna HP-Plot Q (30 m, D.I. 0,53 mm). As amostras foram injetadas sob pressão de 20 psi por 2 min, fluxo de ventilação de 20 mL/min após 30 s de injeção e temperatura do injetor a 200 °C, com corrida isotérmica a 30 ºC utilizando o gás hélio como carregador em fluxo constante de 1 mL/min; temperatura do detector em 250 °C, fluxo de ar e hidrogênio no detector em 450 mL/min e 50 mL/min, respectivamente. A estimativa da quantidade de etileno (produzida pelos frutos) levou em conta o peso dos frutos nos frascos, o volume da atmosfera interna, o tempo de coleta e relacionada à injeção de um padrão de 0,1 µL/ L de etileno em ar sintético da Air Liquid.

3.2.5 Determinação de amido total

Para quantificar o amido total (AT) foi utilizado o método proposto por Cordenunsi e Lajolo (1995). Cerca de 0,5 g de amostra de polpa integral triturada foi homogeneizada com 4 mL de NaOH, 0,5 M, sendo logo em seguida, neutralizada com 4 mL de ácido acético, 0,5 M, e diluída em água até completar um balão volumétrico de 25 mL. Uma alíquota de 1 mL foi retirada do balão e lavada duas vezes com etanol 80%, com o intuito de precipitar o amido (os sobrenadantes foram desprezados). Todo o etanol foi evaporado e o precipitado seco foi incubado em banho-maria a 37 °C com 1 mL de amiloglicosidase (28 U/mL, Sigma A-7255) por

2 h. Após esse tempo, foi adicionado 0,1 mL de ácido perclórico, 0,6 M, para interromper a reação. Alíquotas de 0,1 mL de amostras foram incubadas com 1,5 mL de glicose oxidase/ peroxidase e ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (GOD/POD-ABTS) por 15 min em banho maria a 37 °C. Depois de esfriar foram lidos no espectofotômetro a 450 nm (BioTek Synergy H1).

3.2.6 Açúcares solúveis

A determinação do conteúdo de açúcares solúveis foi realizada utilizando metodologia proposta por Cordenunsi, Shiga e Lajolo (2008). Os açúcares solúveis presentes em 1 g de amostra foram extraídos com etanol 80% (v/v) a 80 °C por três vezes e os sobrenadantes obtidos após centrifugação (12000 *g*; 15 °C; 15 min) foram combinados em balão volumétrico de 25 mL, que teve seu volume completado com etanol 80%. Em seguida, uma alíquota de 1 mL do homogenato foi separada em microtubo e o etanol foi evaporado a vácuo em sistema de concentrador rotativo à vácuo (SpeedVac®, Thermo Fisher- EUA).

Os resíduos sólidos foram reconstituídos em 1 mL de água deionizada, filtrados em membrana (0,45 µm) e analisados por HPLC-PAD (Dionex ICS 5000X, Sunnyvalle, CA, EUA), utilizando coluna Carbopac PA1 (250 x 4 mm, 5 µm de tamanho de partícula, com respectiva pré-coluna). A fase móvel foi constituída de NaOH, 18 mM, em fluxo constante (1,0 mL/min). As injeções (25 µL) foram feitas utilizando injetor automático. Glicose (Sigma G- 8270), frutose (Sigma F-0127) e sacarose (Sigma S-9378) foram utilizadas como padrões de referência. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 7.0. Foram feitos testes t de Student açúcares solúveis totais e testes t de Student e Tukey para amostras de açúcares solúveis.

3.3 OBTENÇÃO DAS PECTINAS

Para a extração da parede celular foi feita adaptação da metodologia usada por SHIGA et al. (2011). Os frutos verdes do mesmo dia de colheita (0 dpc) e as que apresentavam amadurecimento plenamente desenvolvido (9 dpc) foram cortadas, congeladas em N_2 líquido e trituradas em gral de porcelana, com auxílio de pistilo, até serem pulverizadas, sendo armazenadas a -80 ºC.

As amostras pulverizadas, cerca de 40 g, foram mantidas sob refluxo com agitação constante a 70 ºC por 2 h na proporção de 1:6; p/v, em clorofórmio e metanol (1:1; v/v). Em seguida, filtradas e dispersadas em etanol 80% na proporção de 1:6; p/v, a 100 ºC, durante 10 min sob agitação. A amostra foi novamente filtrada e lavada com acetona P.A. O resíduo resultante da extração, com aspecto de pó flocado, doravante denominado pó-cetônico, foi deixado à temperatura ambiente para evaporação completa do solvente. Após a secagem, foi realizada a remoção de compostos fenólicos por ácido tioglicólico como descrita a seguir:

3.3.1 Remoção compostos fenólicos por ácido tioglicólico

O método seguido foi adaptado daquele proposto por Amin et al., (2002). O pó-cetônico foi lavado 3 vezes com acetona 80% a 4 ºC (5:100; p/v) contendo 0,1% de ácido tioglicólico (TGA). Em seguida, foi agitado por 1 h a 4 ºC e centrifugado a 10.000 *g* por 15 min a 4 ºC, e lavado 3 vezes com acetona 70% a 4 ºC, com 0,1% de TGA, agitada por 30 min a 4 ºC e centrifugada a 10.000 *g* por 15 min a 4 ºC. Posteriormente, o material foi lavado com acetato de etila, agitado por 30 min a 4 ºC e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente, seguindo a metodologia descrita por Da Cruz (2016). Ao final, a amostra foi filtrada e lavada com etanol 80% e seca em estufa a 35 ºC.

3.3.2 Extração da fração solúvel em água (FSA)

A amostra seca em estufa foi solubilizada em água deionizada (1:1; p/v), seguida de homogeneização para extração da fração péctica solúvel em água. No processo a amostra foi agitada em banho de ultrassom por 1 h e homogeneizada a cada 10 min com auxílio de uma espátula. A temperatura durante o processo de sonicação foi mantida a 40 ºC ± 2 ºC. Em seguida, foi solubilizada sob aquecimento e agitação constante por 1 h, centrifugada a 400 *g* durante 4 ºC a 45 min. O sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi ressuspendido em água deionizada (SHIGA et al. 2011; SANSONE, 2017).

Após a repetição do processo, os sobrenadantes foram combinados e concentrados em rotaevaporador, a fim de obter um volume menor de amostra. Após esse processo, foi realizada a segunda etapa de remoção de compostos fenólicos, como descrita a seguir.

3.3.3 Remoção compostos fenólicos por PVP

Utilizando-se a metodologia proposta por Holderness et al. (2011), a segunda etapa de remoção de compostos fenólicos consistiu em acrescentar 24 mg de polivinilpirrolidona- triplamente lavado (PVP) a 5 mL do resíduo ressuspendido em água sob agitação por 30 min e, em seguida lavagem com tampão fosfato salino (PBS), seguido de centrifugação e dispersão do precipitado até a completa remoção do PVP. Posteriormente, a solução foi filtrada duas vezes em coluna HiTrap Desalting (5 mL) para completa remoção salina, oriunda do PVP.

Após a remoção dos compostos fenólicos, as amostras foram congeladas em N_2 líquido e liofilizadas. O extrato seco foi denominado “pectina de goiaba madura” (obtida de goiabas madura cv. Tailandesa, 9 dpc) e “pectina de goiaba verde” (obtidas a partir de goiabas verde cv. Tailandesa, 0 dpc).

3.3.4 Obtenção da pectina modificada

A metodologia utilizada para a obtenção da pectina modificada foi adaptada a partir das descritas por Nangia-Makker e seus colaboradores (2002) e por Platt (2009). Cerca de 1,5 g de pectina extraída e liofilizada foi solubilizada em 100 mL de água. O pH foi ajustado para 10,0 com adição de NaOH, 3 M, e depois a amostra foi incubada por 1,5 h a 50- 60 ºC. Em seguida, resfriou-se à temperatura ambiente, ajustou-se o pH para 3,0 com HCl, 3 M, e o material foi deixado 12 h a 4 ºC. Após esse processo a pectina foi precipitada em etanol 70%, deixado overnight a 4 ºC, filtrada e lavada com acetona P.A, seca em estufa a 50 ºC e depois liofilizada. O material resultante foi denominado “pectina modificada de goiaba madura” e “pectina modificada de goiaba verde”, advindas das amostras de pectina de goiaba madura e verde, respectivamente.

3.4 DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E PROTEÍNAS

As pectinas *in natura* e modificadas foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos e de proteínas para assegurar a pureza das amostras.

Para detecção de compostos fenólicos foram realizados os testes de coloração e de Folin-Ciocalteau, também foram realizados com o pó-cetônico, para averiguar a necessidade de se repetir o processo de retirada de compostos fenólicos com TGA e/ou aplicar o método de remoção por PVP.

3.4.1 Teste colorimétrico para identificação das antocianidinas

Para identificar a presença de antocianidinas foi aplicado um teste colorimétrico rápido de hidrólise ácida de glicosídeos. Para tal, foi adicionado uma pequena quantidade de amostra, cerca de 1 g, em 2 mL de HCl, 5 M, aquecido por alguns segundos, sendo a presença dos compostos fenólicos indicada pelo desenvolvimento da coloração rosa (VOIGT, 1993).

3.4.2. Teste de Folin-Ciocalteau

O método foi adaptado de Swain e Hillis (1959) para ensaio em microplaca. Utilizou-se ácido gálico para a curva padrão (2 mg/mL) com 10 pontos, de 0,1- 1 µg/µL, da solução em cada poço, e acrescidos de água para completar 12,5 µL. Para o branco utilizou-se água (12,5 µL) e para as amostras 10 µL da solução mãe de 2 mg/mL. Em seguida todos os poços foram acrescidos de 200 µL de água, 12,5 µL de folin e 25 µL de solução supersaturada de carbonato de sódio (0,5 g/mL de água). A placa foi mantida em repouso, por 30 min a 37 ºC, ao abrigo de luz. O cálculo da quantidade de fenólicos totais nas amostras foi realizado pela interpolação dos dados da absorbância obtido a partir da leitura em espectofotômetro a 720 nm (BioTek Synergy H1) e calculada a equação da reta obtida dos padrões. Os valores foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (EqAG).

3.4.3 Ensaio de proteínas de Bradford

O método proposto por Bradford (1976) para a detecção de proteínas foi adaptado para microplaca. Foram solubilizados 3 mg da amostra em 1 mL de água, tendo como padrão a albumina sérica bovina (BSA). A curva foi feita com 10 pontos em concentrações de 1- 10 µg/µL e o cálculo do teor de proteína da amostra foi realizado a partir dos dados de leitura em espectofotômetro a 595 nm (BioTek Synergy H1) e calculado a equação da reta obtida a partir dos padrões.

3.5 REMOÇÃO DE LPS POR POLIMIXINA B

Para eliminação de endotoxinas, eventualmente presentes nas amostras, foi utilizado o método de remoção de lipopolissacarídeo (LPS) por cromatografia de afinidade utilizando resina de polimixina B (PmB), seguindo a metodologia proposta

pelo fabricante (SIGMA, 1997). Para isso, a resina de polimixina B imobilizada em agarose P1411 (SIGMA ALDRICH, EUA) foi condicionada em coluna de polietileno com 3-5 volumes de solução tampão de bicarbonato de amônio, pH 8,0, 0,1 M, isento de endotoxina para remover o glicerol. Em seguida foi equilibrada com 100 mL do mesmo tampão.

A amostra foi solubilizada em água livre de endotoxina (LONZA, EUA) e aplicada na coluna com uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min. As frações foram recolhidas em tubos estéreis e imediatamente congeladas em N_2 líquido e liofilizadas.

3.6 DETECÇÃO POR MEIO DO ENSAIO DO LISADO DE AMEBÓCITOS DE LÍMOLO

Para avaliar a presença de endotoxinas nas amostras, previamente aos ensaios em cultura celular, foi feito um teste quantitativo para endotoxina bacteriana gram-negativa, através do ensaio do lisado de amebócitos de límulo (LAL). Para isso, foi utilizado o Kit QCL-1000™ LONZA (LONZA, EUA). As amostras de pectina foram acrescidas de inibidor β-G-blocker, 1:1 v/v, (LONZA, EUA) (SANSONE, 2017), e analisadas em triplicata, incluindo o controle positivo, LPS e branco, água livre de endotoxina- própria do Kit (LAL Reagent Water-LRW) e a concentração da endotoxina foi calculada a partir de uma curva padrão. A reação foi realizada conforme instruções do fabricante.

Resumidamente, uma microplaca foi pré-equilibrada a 37 ºC e nos poços foram dispensadas alíquotas de solução de LPS correspondentes a 1, 0,75, 0,5, 0,25 e 0,1 EU/mL e para as amostras foram dispensados 50 µL das amostras (pectinas de goiaba verde e madura, e pectinas modificadas de goiabas verde e madura) nas concentrações de 2 mg/mL e 0,5 mg/mL. Foram, em seguida, adicionados 50 µL de Limulus Amebocyte Lysate (LAL) a cada amostra e a placa foi incubada a 37 °C ± 1 °C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de substrato, disponível no kit, em cada poço, mantendo-se uma taxa constante de pipetagem.

A placa foi incubada novamente nas mesmas condições de temperatura e agitada. Após 6 min foram adicionados 100 µL de ácido acético (25%), reagente

para interrupção da reação. Por fim foi lida em espectrofotômetro a 405 nm (BioTek Synergy H1).

Para a obtenção da curva de calibração e cálculos das médias das absorbâncias foram subtraídas das médias das absorbâncias dos brancos. Sendo consideradas isentas de endotoxinas as amostras com índices próximos ao limite inferior do kit (0,1 EU/mL) (LONZA, 2015).

3.7 COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES NEUTROS E ÁCIDOS URÔNICOS

A composição monossacarídica da fração péctica solúvel em água foi determinada utilizando cromatografia de troca iônica de alto desempenho acoplada a um detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).

Para isso, cerca de 2 mg de amostra liofilizada foi hidrolisada com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA), 2 M, a 120 ºC por 90 min, em seguida adicionou-se álcool butílico terciário para auxiliar na evaporação do ácido, sob fluxo de N_2. As amostras foram secas em fluxo de nitrogênio. Após completa evaporação do ácido, os hidrolisados foram ressuspendidos e solibilizados em 1 mL de água e filtrados (0,45 µm).

Foram analisados em um sistema DX 500 (Dionex, Sunnyvalle, CA, EUA), equipados com uma coluna CarboPac PA10 (250 × 4 mm). A análise de açúcares neutros foi realizada em água (1 mL/min) com ajuste pós-coluna usando NaOH, 300 mM.

A análise de ácido urônico foi realizada no mesmo sistema, utilizando NaOH 150 mM (1 mL/min; 30 min) com um gradiente de acetato de sódio 0-220 mM e a pós coluna ajustada com 150 mM . Os açúcares neutros (arabinose, fucose, galactose, glicose, manose, ramnose e xilose) e ácidos urônicos (ácido glicurônico e ácido galacturônico) foram utilizados como padrões.

3.8 DETERMINAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

As amostras de pectinas foram pesadas (1 mg), solubilizadas em 1 mL de água destilada e filtradas (0,45 µm). Os oligossacarídeos foram determinados por meio de um sistema DX 500 (Dionex, Sunnyvalle, CA, EUA), equipados com uma coluna CarboPac PA10 (2 mm × 250 mm). Oligômeros derivados de açúcares neutros foram eluidos (0,3 mL/ min), com um gradiente linear de NaOH 0,02-0,05 M,

por 3 min e NaOH 0,05-0,075 M, por 10 min, seguido por eluente isocrático de NaOH 0,1 M, por 2 min. Já os oligômeros derivados dos ácidos urônicos foram eluídos com um gradiente de acetato de sódio, NaOAc, 0,1 M por 50 min. Por fim, a coluna foi lavada com NaOAc 0,1 M por 7 min, seguida de NaOH 0,1 M, por 3 min. O equilíbrio foi feito pelo eluente NaOH 0,02, por 20 min.

3.9 FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO

Os polissacarídeos foram analisados por cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho acoplada a um índice de refração e um detector de comprimento de onda múltiplo (HPSEC-RID/MWD). As análises foram realizadas em um sistema Infinity (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) equipado com quatro colunas PL-aquagel-OH, 60, 50, 40 e 30; 300 mm × 7,5 mm (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), conectadas em série nessa ordem. Como fase móvel foi utilizada uma solução de nitrito de sódio, 0,05 M, com azida sódica 0,2%, em fluxo constante de 0,8 mL/min. A separação foi monitorada por detector de índice de refração, com célula de fluxo a 35 ºC. Os tempos de retenção de padrões de dextranos de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma, EUA), nos tamanhos de 750.000, 410.000, 150.000, 80.000, 50.000, 25.000, 12.500 e 5.000 Da, foram usados para a curva de calibração. Uma solução de glicose a 1% foi utilizada para determinar o volume de exclusão total.

3.10 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR)

A espectroscopia em infravermelho foi feita por Refletância Total Atenuada (ATR) com transformada de Fourier ATR-FTIR (Alfa, Bruker, Berlim, Alemanha) com detector DTGS, usando um acessório ATR de salto único (cristal de diamante). A FSA liofilizada foi utilizada para análise espectral. Os espectros foram obtidos em uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e foram utilizados padrões de pectina de citrus com esterificação de 0%, 28,5%, 64% e 92%, obtidos de SIGMA (St. Louis, MO).

Os padrões de 14%, 46%, 64% e 78% foram preparados, usando uma mistura de padrões anteriores para construir a curva de calibração. A partir desses dados obteve-se a equação da reta para analisar o grau de esterificação das pectinas. As amostras foram lidas em triplicata e os espectros foram analisados com

o pacote GRAMS/AI (v. 8) (Thermo Sci.), sendo as bandas de interesse em torno de 1.630 cm^{-1} e 1.740 cm^{-1} (banda de estiramento de íons carboxílicos e bandas decorrentes de grupos éster carbonila, respectivamente).

Os cálculos foram feitos com base na relação da área: A1.740/(A1.740 + A1.630) (MANRIQUE; LAJOLO, 2002; GIL et al., 2016; VRIESMAN; OLIVEIRA, 2009). Posteriormente, foi feito o teste de Tukey com a ajuda do software GraphPad Prism 7.0 para avaliar as diferenças entre os resultados encontrados.

3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.11.1 Cultivo celular

As Células de linhagem monocítica humana (THP-1), proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro, e a linhagem de macrófagos murinos, RAW 264.7, da American Type Culture Collection (ATCC TIB-202; Manassas, VA, EUA), foram cultivadas em meio de cultura, RPMI 1640 (Cultilab, Campinas), para a THP-1, e DMEM (Thermo, EUA), para RAW 264.7, contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas) em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2 a 37 °C, mantidas em repique a cada três dias, conforme as diretrizes da American Type Culture Collection (ATCC, 2017). Para acompanhar a viabilidade e a multiplicação celular, a contagem de células foi feita em câmara de Neubauer, utilizado o corante azul de Tripan (1:1; v/v) (ATCC, 2017; PERES, 2005).

Previamente a cada ensaio das células da linhagem THP-1, foram diferenciadas em macrófagos utilizando forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), a 25 nM em RPMI, por 72 h e em seguida, o meio foi retirado e os poços lavados com 100 µL de PBS estéril. Enquanto as células RAW 264.7, foram incubadas por cerca de 6 h para adesão celular (LEI et al., 2015; LUND et al., 2016).

3.11.2 Incubação

As pectinas foram dissolvidas em meio de cultura, vortexadas e filtradas (0,45 µm). Como grupo controle foram utilizadas as seguintes condições: Branco, contendo apenas meio de cultura, Triton X-100 (0,2%) e incubação com LPS (10 ng/mL). E para as amostras, as pectinas provenientes de goiabas maduras,

goiabas verdes, modificada madura e modificada verde, foram testadas nas concentrações finais de 10; 50; 100 e 200 µg/mL.

3.11.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi avaliada através do teste colorimétrico de redução do corante 3- (4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma, EUA) (MORGAN, 1998; VISTICA et al., 1991).

As células foram distribuídas em placas de 96 poços, com volume de 180 µL/poço, em uma concentração de $2,0 \times 10^5$ cel/poço em seu respectivo meio de cultura, acrescidos de 20 µL do material correspondente ao tratamento em teste.

Foram realizadas triplicatas biológicas e técnicas para todos os tratamentos incubados durante 6; 12; 24 e 48 h.

Posteriormente, os sobrenadantes foram retirados e os macrófagos incubados com 150 µL de MTT (0,5 mg/mL) durante 3 h. Em seguida, foram lavados com PBS e acrescidos de DMSO (100 µL). Mediu-se a absorbância a 540 nm utilizando leitor de microplacas (BioTek Synergy H1). A porcentagem de viabilidade foi expressa em relação ao branco (REILLY et al., 1998; LEMAIRE et al., 2014).

Foi feita a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para avaliar a diferença entre concentrações distintas de uma mesma amostra de pectina, teste t de student para comparar as amostras tratadas ou não com Polimixina B, com a mesma concentração (200 µg/mL), a fim de avaliar a existência de contaminação por endotoxinas.

Ademais, foi feita a análise de regressão linear ($p \leq 0,01$) para avaliar a influência do tempo de incubação sob a viabilidade celular. Todas as análises foram feitas no programa GraphPad Prism 7.0.

3.11.4 Ensaio de proliferação celular por azul de tripan

As células foram distribuídas a uma concentração de $2,0 \times 10^5$ cel/poço em seu respectivo meio de cultura, em placas de 96 poços, com volume de 180 µL/poço, acrescidos de 20 µL de tratamento e incubadas por 0, 6, 24 e 48 h. Foram coletados 10 µL do sobrenadante de cada poço e acrescidos de igual volume de corante azul de Tripan (0,4% em PBS) e realizada a contagem celular em câmara

de Neubauer, em contador automático TC-20 (Bio-Rad, EUA). Foram feitas triplicatas técnicas e biológicas.

Os valores foram expressos em percentual e foi feita a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p \leq 0,01$), para avaliar a diferença entre os tratamentos.

3.11.5 Detecção de citotoxidade por ensaio de desidrogenase lática

A estimativa de morte e lise celular foi feita por ensaio colorimétrico, kit LDH (Roche, Suíça), com base na medição da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada do citosol de células danificadas.

Para isso, as células, em volume de 180 µL/poço ($1x10^5$ cel/mL), foram tratadas com pectinas na concentração final de 200 µg/mL, por 24 h, a 37 °C, 5% de CO_2, em atmosfera umidificada. Posteriormente foram adicionados 5 µL dos controles triton X-100 e branco, em seus respectivos poços, incubados por 15 min. Após a incubação foram adicionados 100 µL da mistura de reação em cada poço, incubados por 30 min a 25 °C. As placas foram agitadas por 10 s, seguida de leitura da absorbância, 490 nm, em leitor de microplacas (BioTek Synergy H1).

O cálculo do percentual de morte celular foi realizado como descrito na bula (Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Suíça), levando em consideração os valores médios de absorbância dos controles e do branco. Os valores foram expressos em percentual de citotoxidade. E feita análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p \leq 0,01$) para avaliar a diferença entre os tratamentos.

3.11.6 Ensaio de espécies reativas de oxigênio

Para a estimativa da produção de ERO as células foram semeadas em volume de 180 µL/poço ($1x10^5$ cel/mL) em placas de 96 poços, tratadas com pectinas, com concentração final de 50, 100 e 200 µg/ mL por 6, 12 e 24 h, a 37 °C, 5% de CO_2, em atmosfera umidificada. Em seguida, o meio foi removido e as células lavadas com PBS previamente aquecido a 37 °C e adicionados 100 µL de 2′,7′- Diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA), 25 µM em cada poço. As células foram incubadas por 45 min a 37 °C, lavadas com PBS e a fluorescência foi lida conforme configuração do leitor de microplaca BioTek Synergy H1 (excitação: 485 nm; emissão: 535 nm).

A análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p \leq 0,01$) foi feita para avaliar a diferença entre concentrações distintas de uma mesma amostra e análise de regressão linear para avaliar se tempo de incubação influencia na produção de espécies reativas. Também foram avaliadas as correlações entre a viabilidade celular por MTT e a produção de espécies reativas pelo teste de Pearson ($p \leq 0,01$). As análises foram feitas no programa GraphPad Prism 7.0.

3.11.7 Ensaio de interleucinas e quimiocinas

Os macrófagos foram tratados com pectinas na concentração final de 10 e 100 µg/mL, em triplicata técnica e biológica, por 24 h, a 37 °C, 5% de CO_2, em atmosfera umidificada, em placas de 96 poços, posteriormente a placa foi centrifugada a 2000 *g* por 10 min. Os sobrenadantes das culturas celulares foram recolhidos e armazenados a -80 ºC. Finalmente foram descongeladas, centrifugadas, previamente à análise de interleucinas e quimiocinas. Para as dosagens utilizou-se a concentração de 2×10^5 cel/poço.

Para as células THP-1 foi utilizado o kit de citocinas inflamatórias humanas, cat.: 551811 (CBA- BD Biosciences, EUA) para dosar IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70 e TNF-α e o kit de quimiocinas, cat.: 552990 (CBA- BD Biosciences, EUA), para CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10.

Para as células RAW 264.7 foi utilizado o kit de citocinas inflamatórias para murinos cat.: 552364 (CBA- BD Biosciences, EUA) para dosar IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, IFN-γ, e TNF-α.

O ensaio foi realizado conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, o padrão foi reconstituído com o diluente, incubado por 15 min e então foi feita a diluição seriada. Em seguida, foi feito um mix das *beads* de captura e adicionados 25 µL em cada tubo. Foram adicionados 25 µL de cada amostra em seus respectivos tubos, foi adicionado o reagente de detecção PE e incubados ao abrigo da luz por 3 h para THP-1 e 2 h para RAW 264.7.

Depois da incubação, foi adicionado o *Wash Buffer*, os tubos foram centrifugados a 2000 *g* por 5 min, os sobrenadantes foram aspirados, descartados e ressuspendidos em 150 µL *Wash Buffer*. Em seguida foi feita a análise no citômetro de fluxo FACSVERSE (BD Biosciences, EUA), utilizando o programa BD FACSuite (BD Biosciences, EUA). Os dados foram analisados utilizando o programa FCAP

Array (BD Biosciences, EUA), em seguida foram realizados os testes estatísticos de Tukey $p \leq 0$ pelo programa GraphPad Prism 7.0.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E FISIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE GOIABAS

Os parâmetros físico-químicos e fisiológicos permitem uma avaliação precisa do estádio de amadurecimento dos frutos, estando intimamente ligados aos aspectos sensoriais, que são significativamente perceptíveis, como a cor. Em goiabas a cor da casca, inicialmente verde escuro (**FIGURA 1 A**), é degradada em amarelo ao longo do amadurecimento (**FIGURA 1 B**), enquanto que na polpa, há uma intensificação da cor vermelha (**FIGURA 1 C e 1D**).

Como observado na **FIGURA 1**, essa cultivar apresenta polpa de cor vermelha suave, enquanto que a casca é mistura entre o verde e o amarelo, ocorrendo, portanto, um aumento da cromaticidade devido ao amadurecimento.

Figura 1. Alterações da cromaticidade da casca e polpa de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. (A) Aspecto da casca de frutos verdes (0 dias pós colheita); **(B)** Aspecto da casca de frutos maduros (9 dias pós colheita); **(C)** Aspecto da polpa de frutos verdes (0 dias pós colheita); **(D)** Aspecto da polpa de frutos maduros (9 dias pós colheita).

De fato, com relação à cor, nossas análises mostram uma redução nos valores do ângulo de tonalidade, avaliados pelo ângulo Hue (ºh), ao longo do amadurecimento **(FIGURA 2 A)**. Os valores para casca foram de 124 ºh para goiabas verdes (0 dpc) e 108 ºh, para goiabas maduras (9 dpc). Para polpa os valores foram de 79,15 ºh, para 0 dpc, e 39,83 ºh, para 9 dpc.

O decaimento da curva mostra que o fruto verde (±130 ºh) tem sua cor degradada em amarelo- esverdeado (±100 ºh) e na polpa há uma mudança gradual do amarelo claro (±70 ºh) culminando em vermelho (±30 ºh), o que é também observado visualmente.

Com relação à firmeza da casca e da polpa, representada pela força necessária para a penetração da probe, os resultados mostram que para a casca os valores foram de 11,81 N aos 0 dpc, e 16,89 N aos 9 dpc. Enquanto para polpa esses valores foram de 67,93 N aos 0 dpc, e 3,9 N aos 9 dpc, para polpa **(FIGURA 2 B)**

Associado à perda da firmeza, foi observada também uma progressiva perda de massa **(FIGURA 2 C)**. O maior valor de perda foi de 13,45% aos 9 dpc. Inicialmente, os frutos tiveram uma média de peso de 185 g e, ao final, esse peso estava em torno de 160 g. Apesar do desvio padrão alto decorrente da heterogeneidade das amostras, a essa perda foi significante.

Com relação à taxa de respiração, indicada pela produção de CO_2 (2,22 µmol de CO_2 $kg^{-1}.h^{-1}$) e produção de etileno (0,22 $nLg.kg^{-1}.h^{-1}$), observamos que os picos mais acentuados de ambas estão por volta dos 9 dpc **(FIGURA 2 D)**, o que configura o amadurecimento pleno do fruto. Depois desse processo, houve um decaimento da curva, indicando que o fruto começou a entrar em processo de senescência.

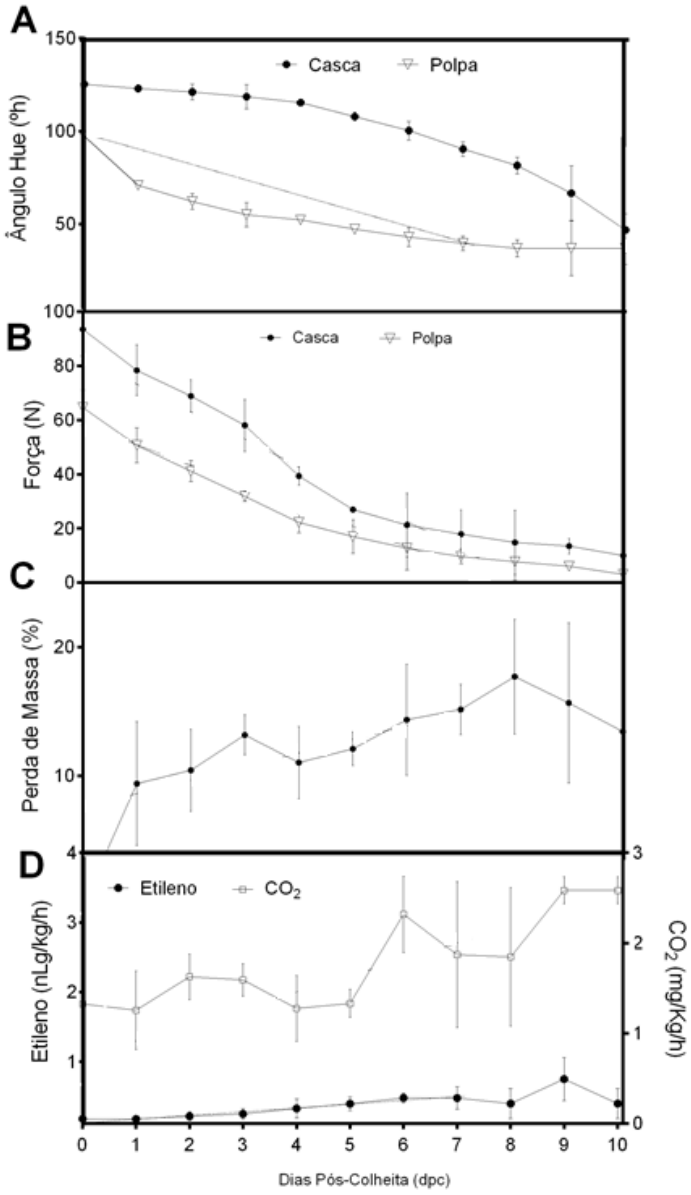

Figura 2. Parâmetros físico-químicos para o acompanhamento da maturação de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa ao longo de 10 dias após a colheita do fruto (dpc). (A) Perfil colorimétrico da polpa e casca, expressos em ângulo hue (ºh); **(B)** Firmeza da polpa e da casca, expressos em Newton (N); **(C)** Percentual de perda de massa (%); **(D)** Perfil de produção de etileno ($nLg.kg^{-1}.h^{-1}$) e Co_2 (CO_2 kg^{-1} h^1). Barras verticais indicam desvio padrão da média (n=12).

Durante o amadurecimento observamos um aumento significativo com relação aos açúcares solúveis totais (**FIGURAS 3 A**). Individualmente, observamos um aumento significativo de frutose e sacarose e diminuição de glicose (**FIGURA 3 B**). Com relação aos teores, temos uma maior quantidade de frutose, seguido de glicose e sacarose, tanto nos frutos verdes, quanto nos frutos maduros.

Apesar da diminuição nos teores de glicose devido ao processo de amadurecimento, os açúcares solúveis totais, ainda sim, foram maiores nos frutos maduros. Com relação ao teor de amido, não foi detectado sua presença nos frutos.

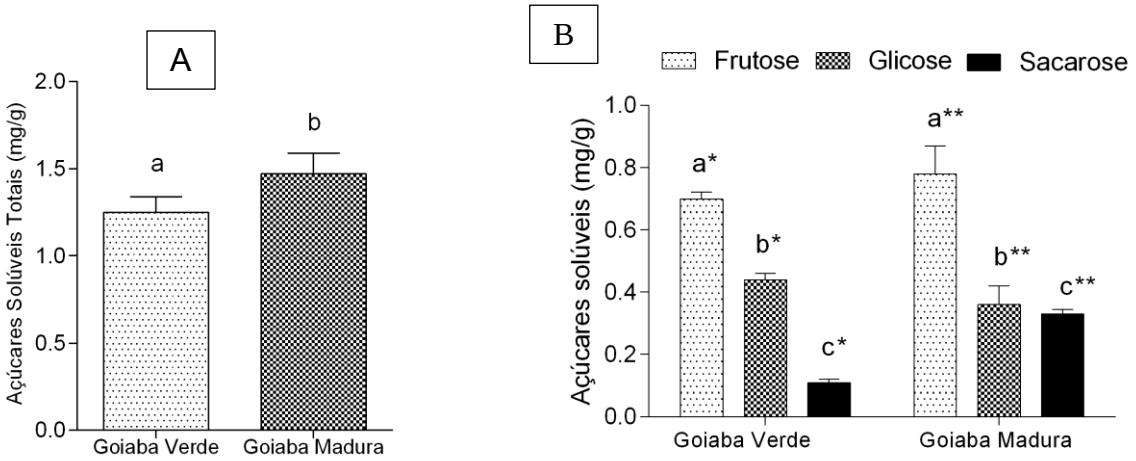

Figura 3. Composição de açúcares solúveis de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. verdes e maduras. (A) Teores de açúcares solúveis totais (glicose + frutose + sacarose) de frutos verdes e maduros, expressos em mg/g de goiaba fresca. Letras diferentes (a, b) sobre as barras indicam diferença estatística entre as amostras pelo teste t de Student (p≤ 0,01). Barras verticais indicam desvio padrão da média. **(B) Composição de açúcares solúveis** (glicose, frutose e sacarose) de frutos verdes e maduros expressos em mg/g. As letras (a, b, c) sobre as barras indicam diferença estatística entre os diferentes açúcares em goiabas verdes e em goiabas maduras, pelo teste de Tukey (p≤ 0,01). Caracteres indicados por *,**, mostram a diferença estatística entre um mesmo açúcar antes e depois do amadurecimento pelo teste t de student (p≤ 0,01). Barras verticais indicam desvio padrão da média.

4.2 ISOLAMENTO DE PECTINAS E MODIFICAÇÕES

Foram extraídas as frações solúveis tanto da goiaba verde, quanto da goiaba madura. Cada uma dessas frações foi então modificada conforme descrito em métodos, resultando em quatro amostras: pectina de goiaba madura, pectina modificada de goiaba madura, pectina de goiaba verde e pectina modificada de goiaba verde, o esquema abaixo mostra simplificadamente como foram obtidas das amostras (**FIGURA 4)**.

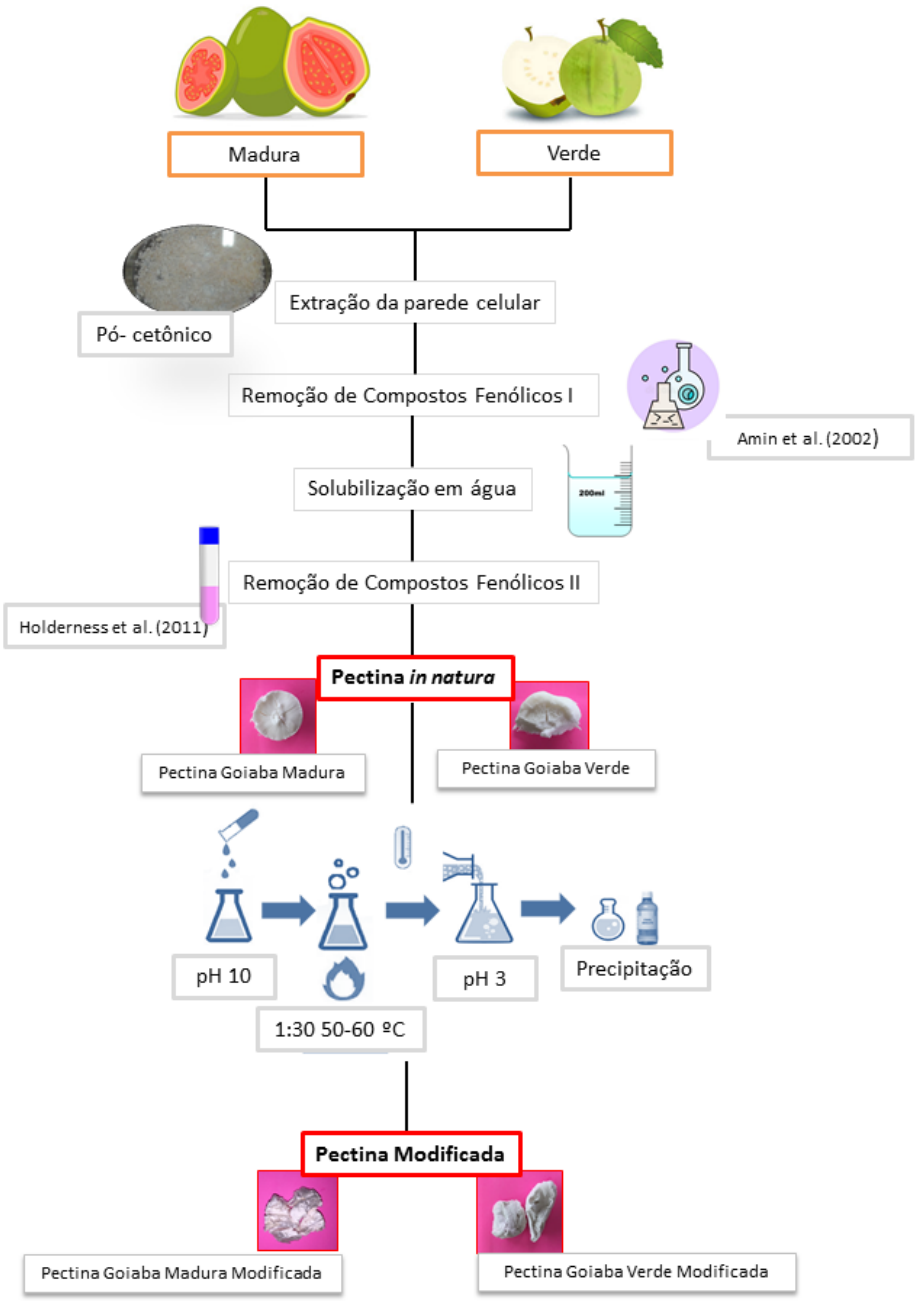

Figura 4. Esquema simplificado das etapas empregadas para a obtenção de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa verdes e maduras e suas versões modificadas.

Os rendimentos para goiaba madura foram de 0,46±0,03 g/100g, e para de goiaba verde, 0,65±0,028 g/100g. Para as versões modificadas, o aproveitamento foi de 100% (±0,001%).

4.2 PRESENÇA DE PROTEÍNAS E COMPOSTOS FENÓLICOS

Não foi detectada a presença de proteínas, em qualquer uma das amostras, determinadas pelo método de Bradford.

Em relação aos compostos fenólicos, foram utilizados para a detecção os testes de Folin-Ciocalteu e o teste colorimétrico para identificação de antocianidinas. O primeiro mensura a capacidade antioxidante de uma amostra, e apresenta boa correlação linear com o perfil de fenóis totais e a atividade antioxidante (DJERIDANE et al 2006; SURVESWARAN et al., 2007).

Já o segundo, é um teste preditivo que indica a presença de taninos, por meio da formação de um produto rosa, que se deve a despolimerização oxidativa dos taninos condensados e catalisada por ácido (WOLLGAST; ANKLAN, 2000; EFRAIM et al., 2006). Não foi detectada a presença de compostos fenólicos por ambos os testes.

4.3 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E TAMANHO MOLECULAR

A fim de caracterizar as pectinas quanto à composição monossacarídica e tamanho molecular foram feitas, respectivamente, as análises por cromatografia de troca iônica (HPAEC-PAD) e fracionamento por cromatografia por exclusão de tamanho- HPSEC.

A análise estatística da composição de monossacarídeos mostrada na **FIGURA 5** revela que apesar das proporções diferirem entre a pectina modificada e não modificada, a principal característica comum é a alta proporção de ácido galacturônico- GalA (66%; 63%; 57% e 47% para pectina de goiaba verde, pectina de goiaba madura, pectina modificada de goiaba verde e pectina modificada de goiaba madura, respectivamente, seguido de arabinose (Ara) e galactose (Gal) e como componente menos abundante o ácido glicurônico (GlcA).

A pectina de goiaba madura teve uma diminuição na proporção de manose (Man), quando comparada à pectina de goiaba verde.

Com relação às pectinas modificadas, a modificada de goiaba madura possui uma maior proporção de fucose (Fuc) e Gal e uma menor proporção de Ara e Man, quando comparada à pectina modificada de goiaba verde.

A pectina de goiaba madura quando modificada tem um aumento significativo de Fuc, Ara e Gal e como consequência, a diminuição de GalA. Já a pectina de

goiaba verde quando modificada tem uma perda significativa de GalA, com aumento não significativo de outros componentes monossacarídicos.

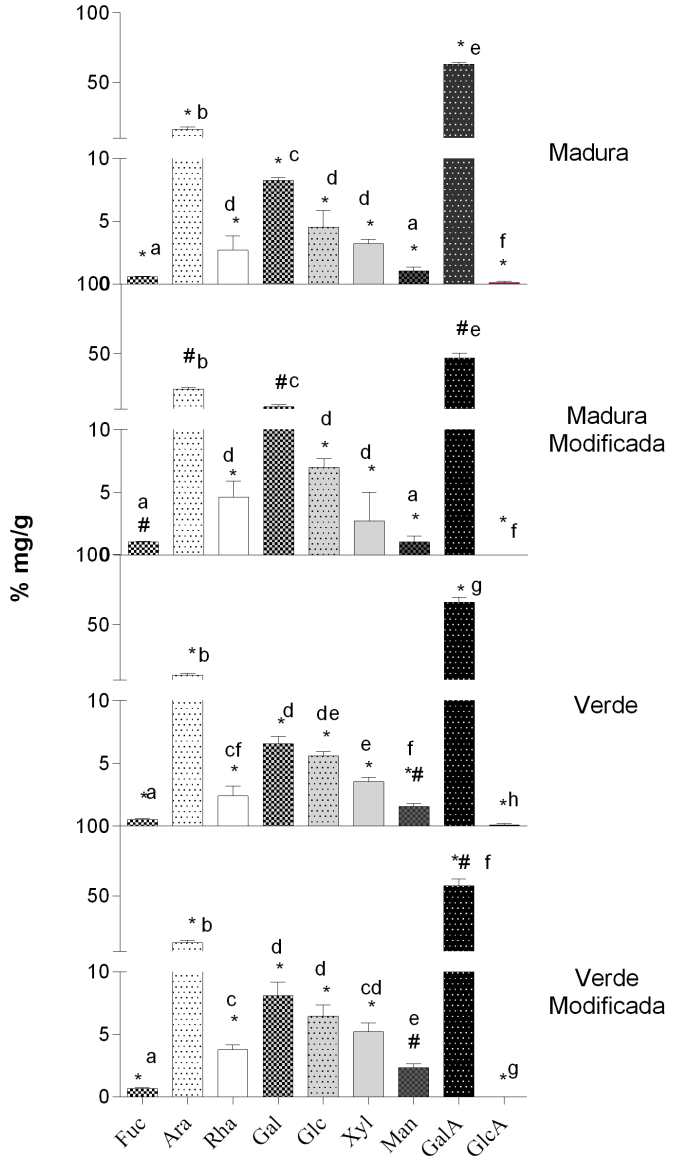

Figura 5. Composição monossacarídica de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa determinada por cromatografia de troca iônica. De cima para baixo: (1) Madura: pectina obtida de goiabas maduras (9 dias pós colheita); (2) Modificada Madura: pectina obtida a partir da modificação química da amostra de pectina madura; (3) Verde: pectina obtida de goiabas verdes (0 dias pós colheita); (4) Modificada Verde: pectina obtida a partir da modificação química da amostra pectina verde. Os Monossacarídeos analisados: neutros: fucose (Fuc), arabinose (Ara), galactose (Gal), glicose (Glc), xilose (Xyl) Manose (Man) e, ácidos urônicos: ácido galacturonico (GalA) e glicurônico (GlcA) são descritos em percentual de mg/g de polissacarídeo liofilizado. Caracteres (*,#) mostram a diferença da proporção entre os monossacarídeos de diferentes amostras. Letras (a- g) entre a proporção dos monossacarídeos de uma mesma amostra. Ambos comparados por teste de Tukey (p≤0,01). Letras ou caracteres iguais indicam que as médias não diferiram entre si estatisticamente. Barras verticais indicam desvio padrão da média.

O perfil molecular com relação ao tamanho das pectinas revelado pela cromatografia de exclusão de tamanho, **FIGURA 6**, mostra que pectina de goiaba madura, apresentada no cromatograma A, apresentou três picos, com peso molecular em torno de 887, 5 e 3 KDa. Com o processo de modificação (cromatogramas B), houve diminuição considerável do peso molecular, em torno de 106 KD, com perda dos componentes de menor peso, 5 e 3 KDa.

Para as amostras de pectina de goiaba verde (cromatograma C), foi observado um alto peso molecular de 1.427, 5 e 3 KDa, enquanto sua versão modificada apresentou picos de 116, 5 e 3 KDa, mostrando que houve degradação dos polissacarídeos de alto peso molecular.

De fato, a diferença mais evidente é que as pectinas foram degradadas ao longo do processo de amadurecimento e que a pectina modificada de goiaba madura foi a única a não apresentar polissacarídeos de 3 e 5 KDa.

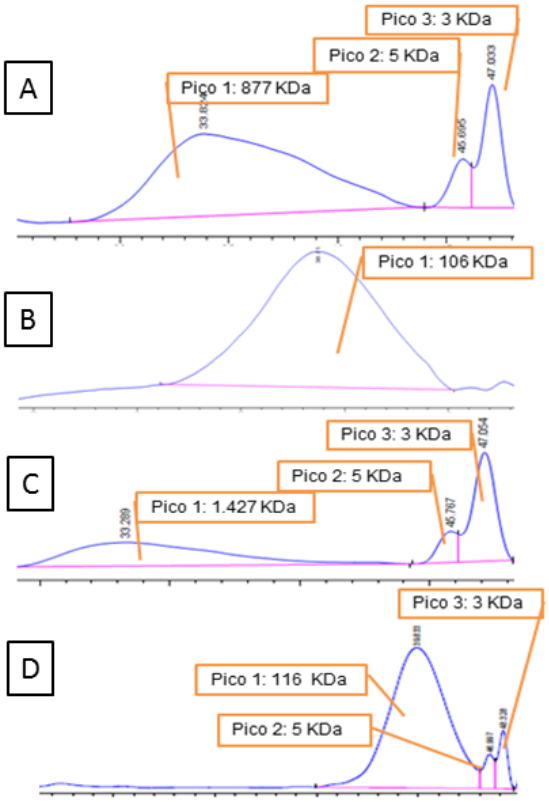

Figura 6. Cromatogramas por exclusão de tamanho de diferentes amostras de pectina de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa separadas em colunas PL-aquagel-OH (60, 50, 40 e 30; 300 mm × 7,5 mm). (A) Pectina obtida de goiabas maduras (9 dias pós colheita). Pico 1: 887 KDa, Pico 2: 5 KDa, Pico 3: 3 KDa; **(B)** Pectina modificada de goiaba madura, obtida partir da modificação química da amostra de pectina obtida de goiaba madura. Pico1: 106 KDa; **(C)** Pectina de goiabas verdes (0 dias pós colheita), Pico 1: 1.427 KDa, Pico 2: 5 KDa, Pico 3: 3 KDa ; **(D)** Pectina modificada de goiaba verde, obtida a partir da modificação química da amostra de pectina obtida de goiaba verde. Pico 1: 116 KDa.

As amostras de pectinas também foram avaliadas quanto à presença de oligossacarídeos. O cromatograma apresentado na **FIGURA 7** revela a presença de monossacarídeos e oligossacarídeos nas diferentes amostras. Na abcissa os componentes mais à esquerda indicam a presença de monossacarídeos e os picos à direita representam a existência de oligossacarídeos. Embora não tenha sido possível quantificar ou determinar qualitativamente os oligossacarídeos devido à falta de uma biblioteca, foi possível identificar sua presença.

Aparentemente, com o amadurecimento ocorreu hidrólise de polissacarídeos da parede celular, resultando no aumento de oligossacarídeos e monossacarídeos em pectinas de goiabas maduras, entretanto, com a modificação tanto da pectina de goiaba madura quanto verde, há uma perda desses componentes.

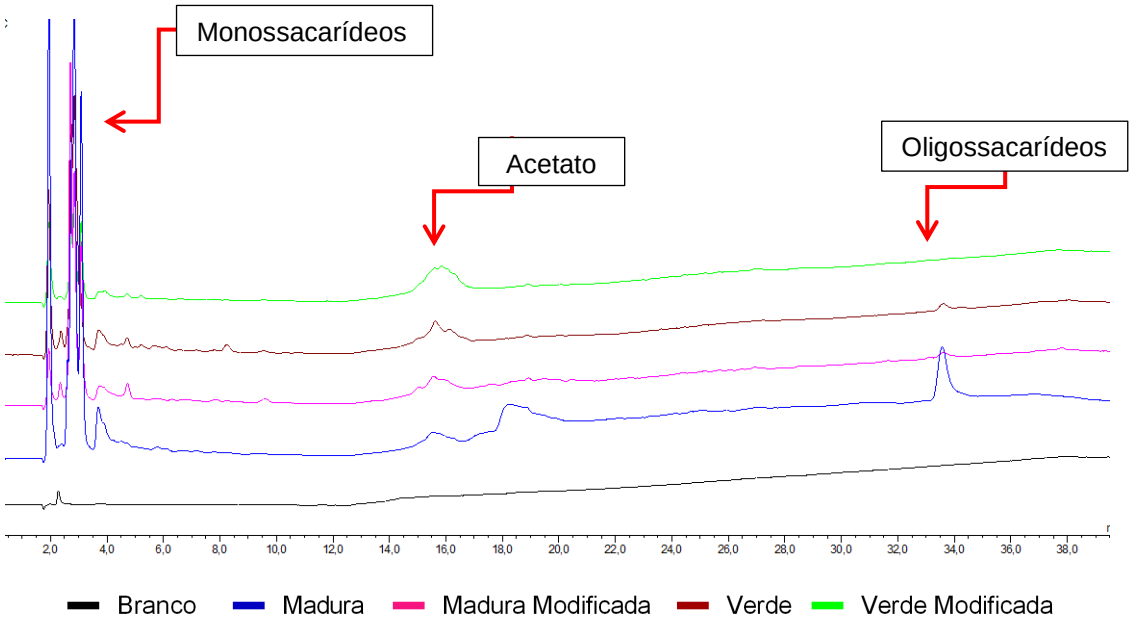

Figura 7. Perfil cromatográfico de pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa quanto à presença de monossacarídeos e oligossacarídeos nas diferentes amostras, determinado por cromatografia de troca iônica com coluna CarboPac PA10 (2 mm × 250 mm). Picos à esquerda indicam a presença de monossacarídeos e os picos à direita indicam a presença de oligossacarídeos. De baixo para cima os espectros representam: 1- branco (linha preta), 2- pectina de goiaba madura (linha azul), 3- pectina modificada obtida goiaba madura (linha rosa), 4- pectina de goiaba verde (linha marrom), 5- pectina modificada de goiaba verde (linha verde). As setas indicam monossacarídeos à esquerda, ao centro o pico correspondente ao eluente acetato e à direita os oligossacarídeos.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR INFRAVERMELHO

O espectro infravermelho (**FIGURA 8**) nos fornece informações para identificação de um composto a partir de sua estrutura. Bandas entre 1200 e

900 cm^{-1} encontramos a ligação C-O-C, característica de carboidratos. Em 3600 e 3000 cm^{-1} temos a ligação O-H, que são tipicamente observadas nos monossacarídeos. Na banda com comprimento de onda 1567 cm^{-1}, com menor intensidade, pode ser atribuída à lignina residual ligada ao polissacarídeo (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; DALONSO et al., 2009; SILVA et al., 2013).

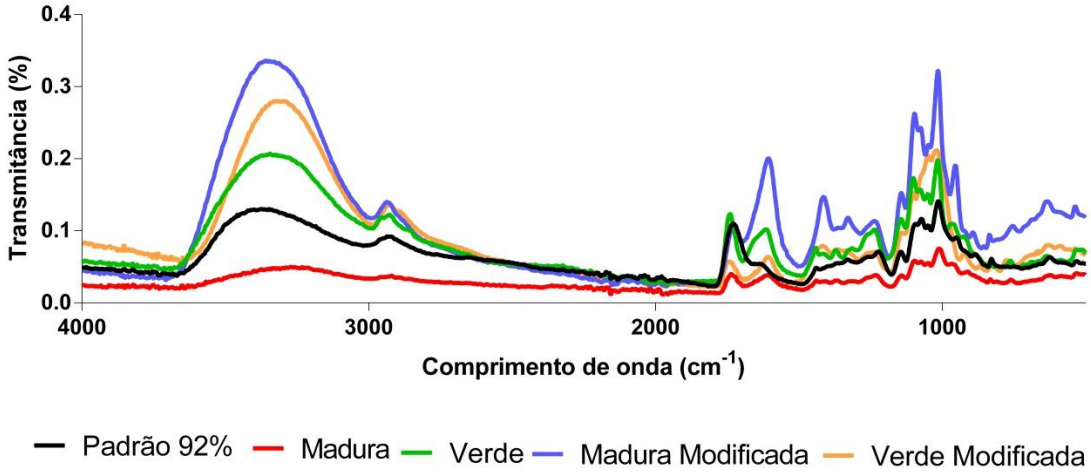

Figura 8. Espectroscopia de infravermelho, pela técnica de Refletância Total Atenuada (ATR) com transformada de Fourier ATR-FTIR e com detector DTGS de diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. Espectro infravermelho de pectinas de citros com 92% de esterificação (padrão- representado pela cor preta), pectina de goiaba madura (vermelho), pectina de goiaba verde (verde), pectina modificada de goiaba madura (azul), pectina modificada de goiaba verde (laranja).

Para medir a proporção dos grupos carboxílicos esterificados foi utilizado o grau de esterificação (**FIGURA 9**) (SRIAMORNSAK, 2003). O grau de esterificação é uma medida proporcional de grupos metoxílicos (-CH3) ou de grupos carboxílicos (-COO) esterificados, em relação ao total de unidades de ácido galacturônico (GAVA; DA SILVA; FRIAS, 2009; FIB, 2014).

Este cálculo foi realizado com relação as banda de interesse que estão em torno de 1630 cm^{-1} e 1740 cm^{-1}, que compreendem a banda de estiramento de íons carboxílicos e bandas decorrentes de grupos éster carbonilo, respectivamente (MANRIQUE; LAJOLO, 2002; GIL et al., 2016; VRIESMAN; OLIVEIRA, 2009).

O processo de amadurecimento, assim como o de modificação química, promove uma diminuição significativa do grau de esterificação (GE). Os resultados

do grau de esterificação foram de 77,4% para pectina de goiaba verde, 62,7%, para pectina de goiaba madura, 63,3% para pectina modificada de goiaba verde e 49,1% para pectina modificada de goiaba madura. Com exceção da pectina modificada de goiaba madura, todas são consideradas ATM (**FIGURA 9**).

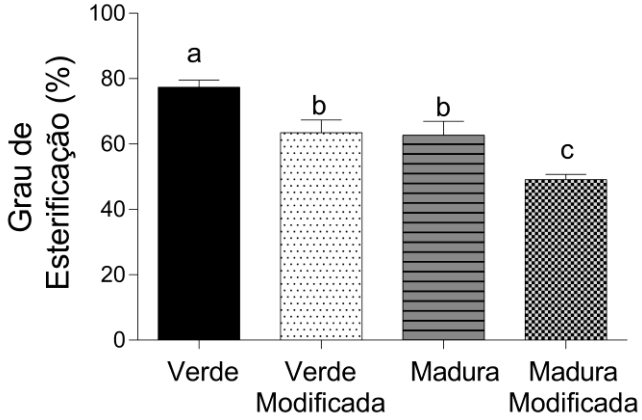

Figura 9. Percentual do grau de esterificação de diferentes pectinas extraídas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. Dados resultantes da razão entre as bandas 1.630 cm^{-1} e 1.740 cm^{-1}, obtidas por espectroscopia de infravermelho, pela técnica de Refletância Total Atenuada (ATR) com transformada de Fourier ATR-FTIR e com detector DTGS. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre as médias, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$). Barras verticais indicam desvio padrão da média.

4.4 DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS

O ensaio para detecção da presença de endotoxinas nas amostras, empregando ensaio do lisado de amebócitos de límulo (LAL), revela que quaisquer uma das amostras de pectinas testadas foram consideradas livres de agentes contaminantes tóxicos, como o LPS, visto que, índices próximos ao limite inferior do kit (0,1 EU/mL) são considerados isentos de contaminação (LONZA, 2015). Os valores de absorbância de todas as pectinas testadas ficaram abaixo do limite de detecção da curva, como apresentado abaixo na **FIGURA 10**.

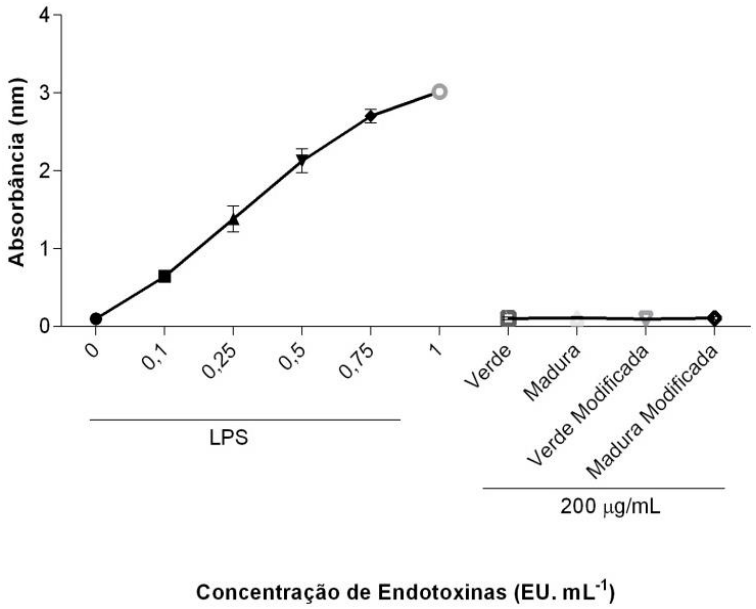

Figura 10. Concentração de endotoxinas em diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa por meio do ensaio do lisado de amebócitos de límulo (LAL). Ao lado esquerdo temos a curva padrão, constituída de diferentes concentrações de LPS (EU/mL), lida em espectrofotômetro a 405 nm. Ao lado direito temos o resultado obtido das diferentes pectinas testadas numa concentração de 200 µg/mL. Foram testadas a pectina de goiaba verde, pectina de goiaba madura, pectina modificada de goiaba verde e pectina modificada de goiaba madura em relação à concentração de endotoxinas, O cálculo foi feito em relação à curva.

4.5 CÉLULAS THP-1

4.5.1 Viabilidade Celular por MTT

A viabilidade de células THP-1 em presença de pectinas foi avaliada por meio do ensaio de MTT. Os resultados revelam que, de modo geral, as amostras e concentrações testadas apresentam viabilidade maior que o controle negativo (triton X-100), como mostrado na **FIGURA 11**. Todas as amostras foram calculadas em relação ao branco (apenas meio de cultura).

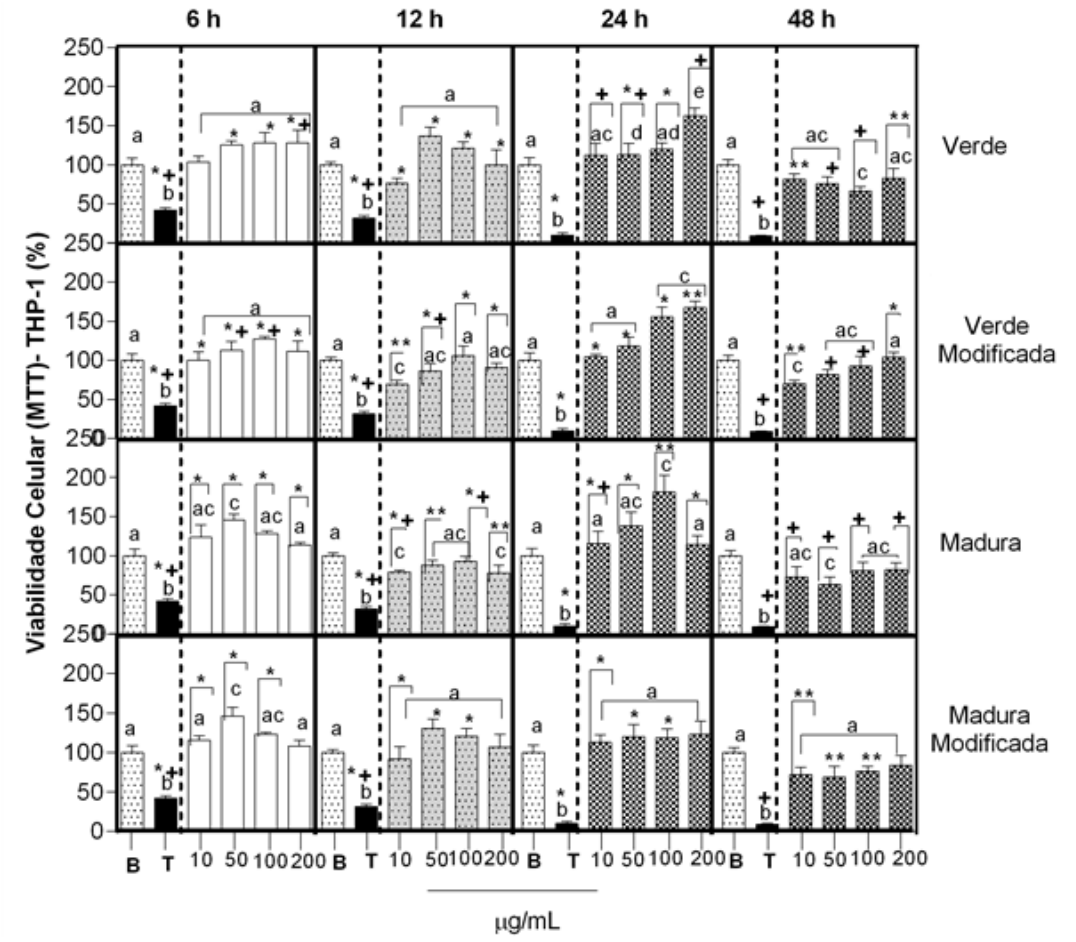

Figura 11. Viabilidade de células THP-1 por MTT quando incubadas com diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. Percentual de viabilidade celular calculada em relação ao branco (células incubadas apenas com meio de cultura). Foram testados diferentes tempos de incubação (6, 12, 24 e 48 h), com as pectinas de goiaba verde, pectinas de goiaba modificada verde, pectinas de goiaba madura e pectinas modificada de goiaba madura, em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 µg/mL). As letras sobre as barras (a, b, c) mostram diferença estatística significante, entre as médias de um mesmo tratamento, em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 µg/mL), pelo teste de Tukey (p≤0,01) e entre um tratamento e branco e controle negativo (triton X-100). Caracteres (***; **;** +) mostram diferença estatística significante, entre as médias de um mesmo tratamento e mesma concentração, porém em diferentes tempos de incubação (6, 12, 24 e 48 h), pelo teste de Tukey (p≤0,01).

Aparentemente, ao analisar os gráficos, observa-se um aumento e diminuição da viabilidade com o aumento do tempo de incubação. Para tanto, foi feita a análise de regressão linear a fim de analisar se as variáveis tempo e concentração estavam condicionadas a uma relação de dependência. Apenas algumas das amostras de determinadas concentrações, como podemos observar na **FIGURA 12**, tiveram seu percentual de viabilidade celular, determinado pelo MTT, atrelado ao tempo de incubação, como é o caso de células THP-1 incubadas com 50 e 100 µg/mL de

pectina de goiaba verde, 50 µg/mL de pectina de goiaba madura, 10, 50 e 100 µg/mL de pectina modificada de goiaba madura. Além disso, observamos que todas essas amostras apresentaram tendência à diminuição da viabilidade com o decorrer do tempo.

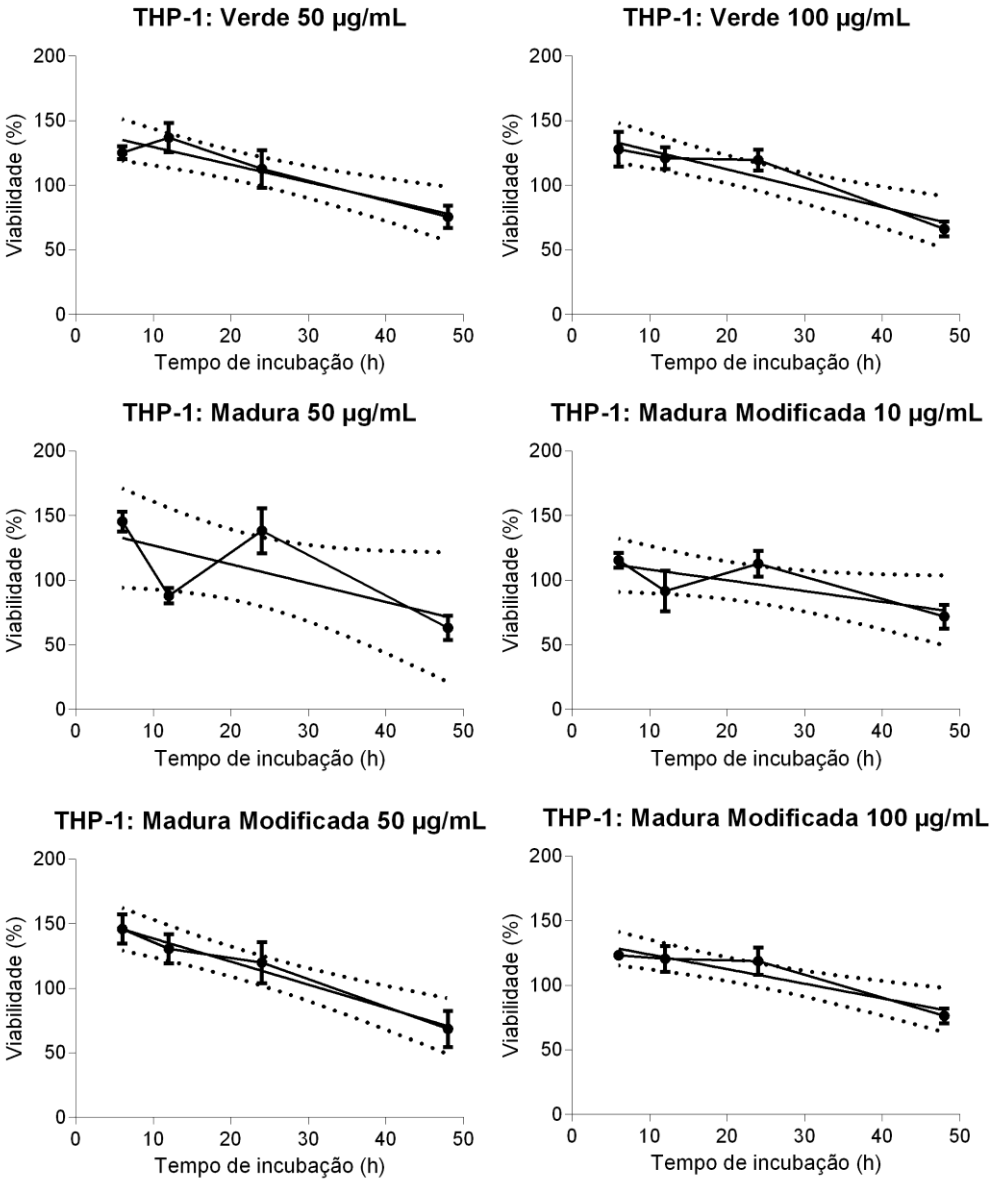

Figura 12. Relação entre viabilidade celular por MTT e tempo de incubação de diferentes pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa incubadas em células THP-1. Gráficos de regressão linear ($p \leq 0,01$) com curva de tendência (linha central) em amostras que tiveram diferença estatística significante para a relação viabilidade celular e tempo de incubação.

Ao observarmos a figura 11 (p. 55), aparentemente determinadas amostras de pectinas promovem um aumento e/ou diminuição da viabilidade conforme há um aumento das concentrações utilizadas nas células. Para tal, a análise de regressão linear mostra que apenas as amostras de pectina de goiaba verde (24 h) e modificada de goiaba verde (24 e 48 h) apresentaram tendência de aumento na viabilidade com o aumento da concentração (**FIGURA 13**).

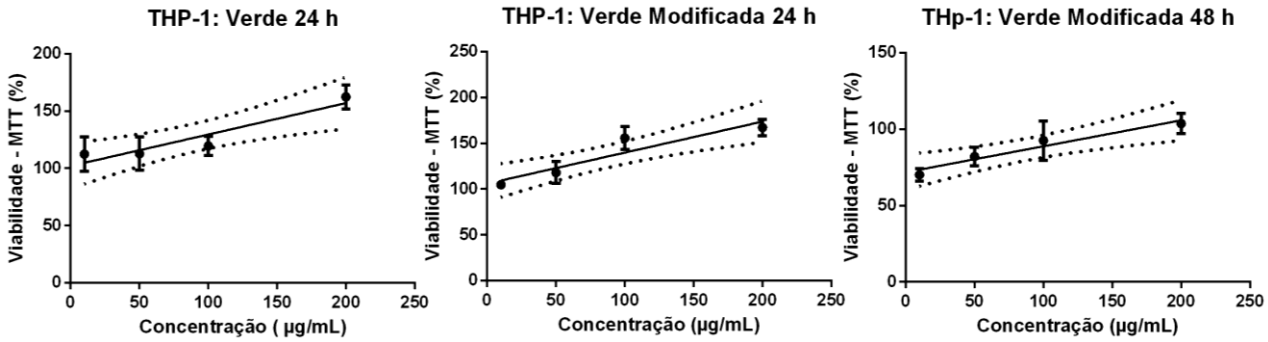

Figura 13. Relação viabilidade de células THP-1 por MTT e concentração da amostra de diferentes pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. Gráficos de regressão linear (p≤0,01) com curva de tendência (linha central) em amostras que tiveram diferença estatística significante para a relação viabilidade celular com diferentes concentrações de uma mesma amostra, durante um mesmo tempo de incubação.

4.5.2 Proliferação e morte celular

A fim de avaliar proliferação ou morte celular, foi feito o ensaio de contagem de células por coloração com azul de tripan e LDH respectivamente. Como pode ser observado na **FIGURA 14 A**, não houve diferença estatística entre a contagem de células sem incubação (0 h) com as diferentes pectinas e nas horas subsequentes (6, 12 e 48 h), numa concentração de 200µg/mL.

Da mesma forma, o ensaio de LDH, apresentado na **FIGURA 14 B**, mostrou que a mais alta concentração de qualquer uma das amostras de pectinas não foi citotóxica.

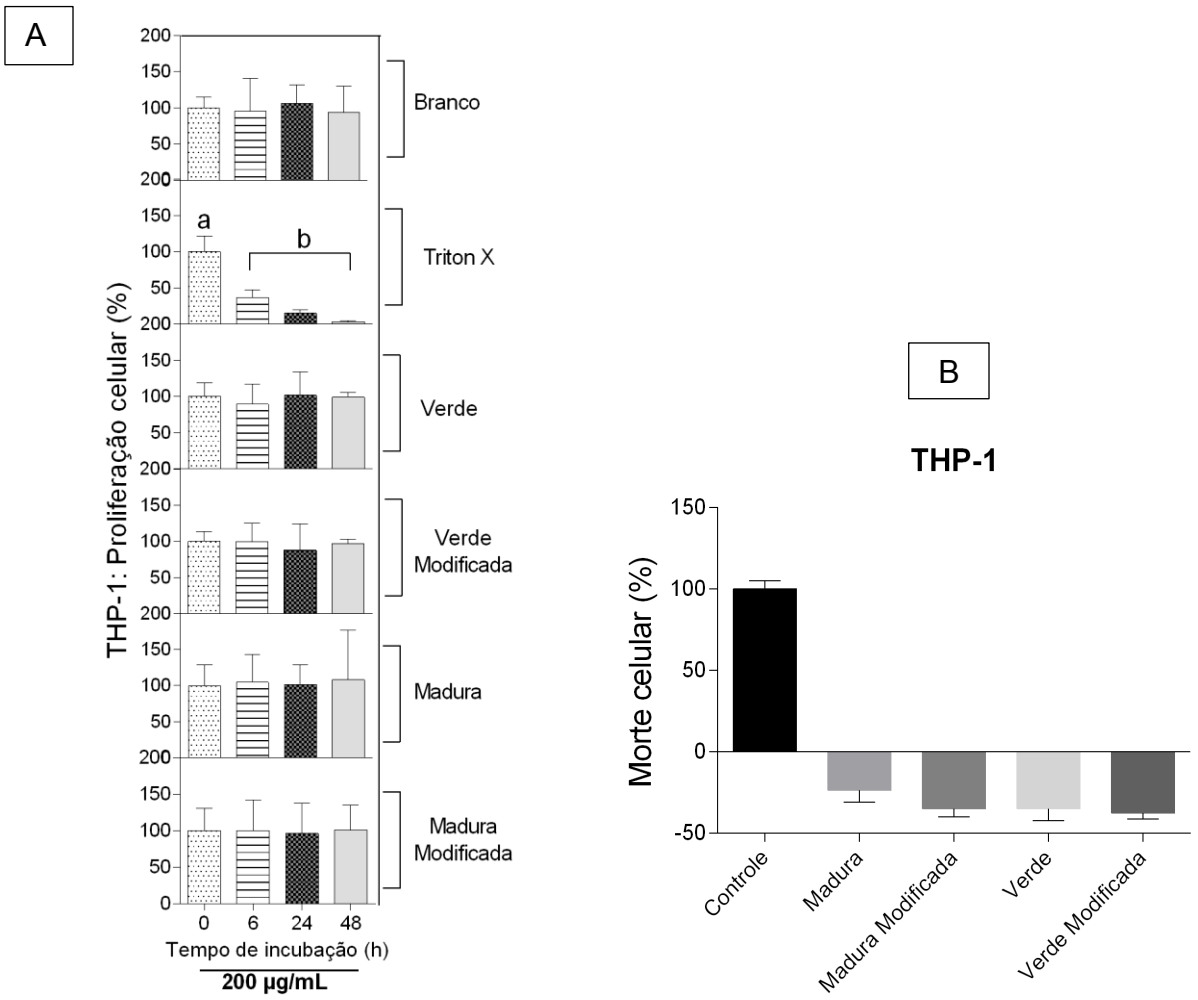

Figura 14. Avaliação da proliferação e morte de células THP-1 incubadas com diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. (A) Proliferação celular por coloração azul de tripan. O resultado do percentual de células viáveis foi calculado em relação às células não tratadas (tempo 0) com concentração inicial de $2{,}0\times10^5$ células/poço, em triplicata biológica e técnica. Os valores de células viáveis foram obtidos por contador automático TC-20 (BioRad). As células foram incubadas com suas respectivas pectinas, com concentração de 200 µg/mL, e contadas nos tempos 6, 24 e 48 h. Foram utilizadas as pectinas de goiaba madura, modificada de goiabas maduras, verdes e modificada de goiabas verde. As letras diferentes indicam que as médias diferiram entre si estatisticamente e as letras omitidas indicam que as médias não diferiram entre si quando avaliadas pelo teste de Tukey ($p\leq0{,}01$). Barras verticais indicam o desvio padrão da média. **(B) Citotoxidade por LDH.** O percentual de morte celular foi calculado em relação ao triton X-100. Letras diferentes indicam que as médias diferiram entre si estatisticamente, letras iguais indicam que as médias não diferiram entre si. Barras verticais indicam desvio padrão da média.

4.5.3 Espécies reativas de oxigênio

Na avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, foi observado que, de modo geral, as células tratadas com as diferentes pectinas produção de

ERO quando comparadas ao branco, e aparentemente houve tendência geral de diminuição com tempo de incubação mais longo.

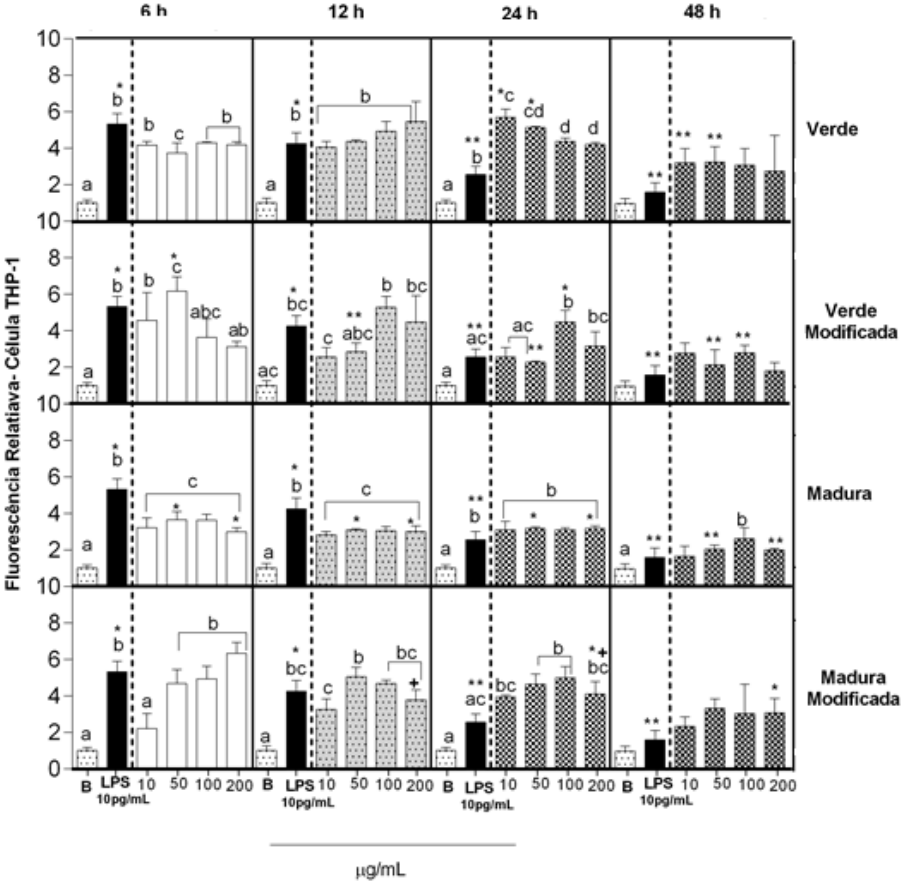

Figura 15. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células THP-1 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. A fluorescência relativa em unidade relativa foi calculada em relação ao branco (células apenas com meio de cultura). As letras (a, b, c) mostram diferença estatística significante entre as médias de um mesmo tratamento (pectina de goiaba verde, pectina de goiaba madura, pectina modificada de goiaba madura e pectina modificada de goiaba verde), em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 µg/mL), pelo teste de Tukey (p≤0,01) e entre um tratamento com pectina com relação ao branco e o controle positivo, LPS (10 pg/mL). Os caracteres (***; **; +**) mostram diferença estatística significante, entre as médias de um mesmo tratamento e mesma concentração, porém em diferentes tempos de incubação (6, 12, 24 e 48 h), pelo teste de Tukey (p≤0,01). Barras verticais indicam desvio padrão da média.

A regressão linear, **FIGURA 16**, mostra que há uma correlação positiva entre a quantidade de ERO produzida e o tempo de incubação, nas amostras tratadas com LPS, pectina de goiaba verde (100, 200 µg/mL), pectina modificada de goiaba verde (50, 200 µg/mL), pectina de goiaba madura (10, 50, 100, 200 µg/mL) e pectina modificada de goiaba madura (50, 100, 200 µg/mL). Além disso, há uma tendência à diminuição ao longo do tempo.

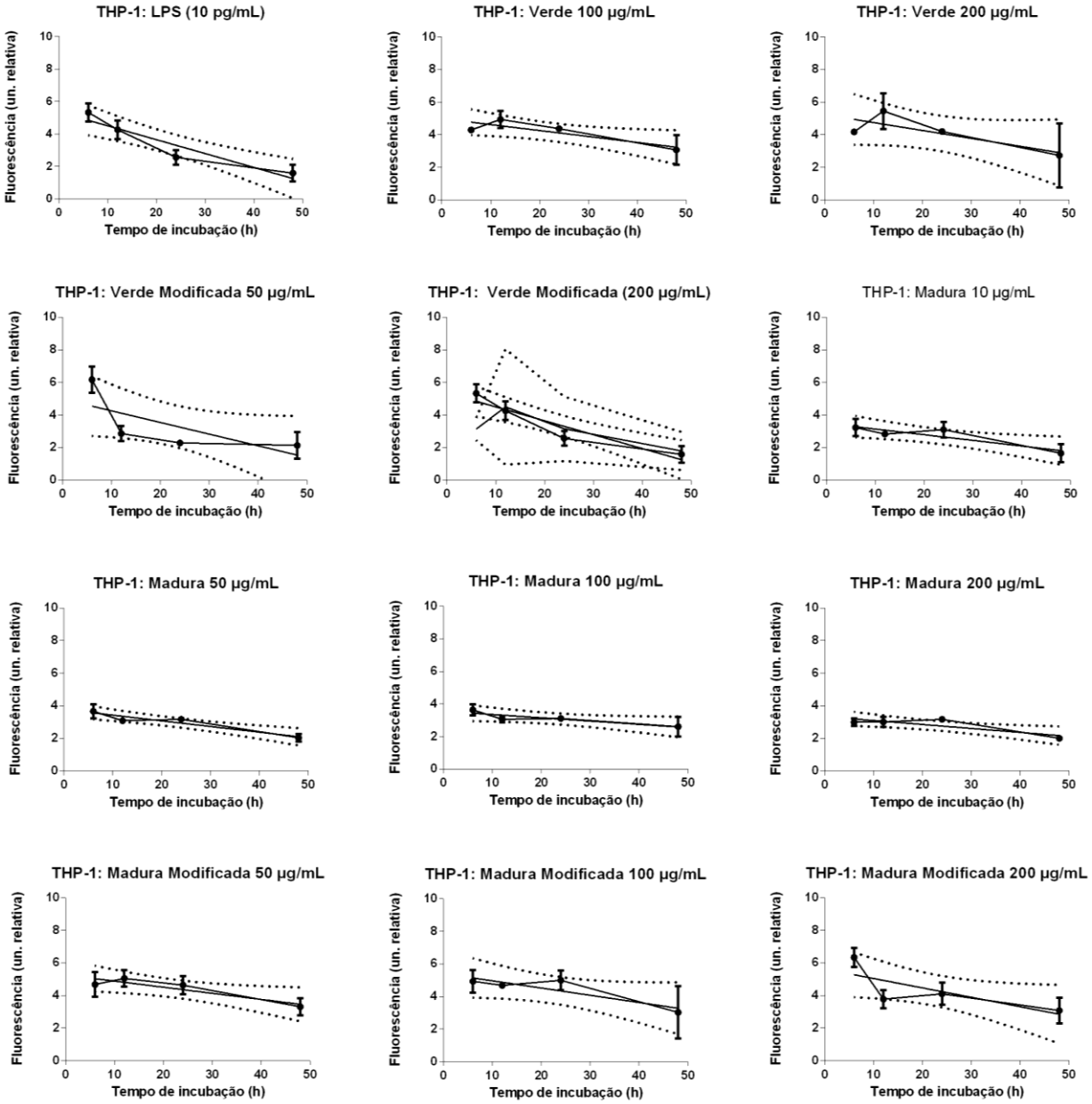

Figura 16. Relação entre produção de ERO e tempo de incubação de células THP-1 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. A figura mostra gráficos de regressão linear (p≤0,01) com curva de tendência (linha central) em amostras que tiveram diferença estatística significante para a relação entre fluorescência relativa, ou seja, produção de ERO, e tempo de incubação.

No entanto, apenas as amostras de pectina de goiaba verde (12, 24 h), modificada de goiaba verde (12 h) e modificada de goiaba madura (6h) apresentaram correlação positiva entre a quantidade de ERO produzida e o aumento da concentração de amostra utilizada na incubação com células THP-1, com tendência de aumento de ERO. Exceto para pectina de goiaba verde em 24 h que

teve tendência a diminuição de ERO com maior concentração de pectina (**FIGURA 17**).

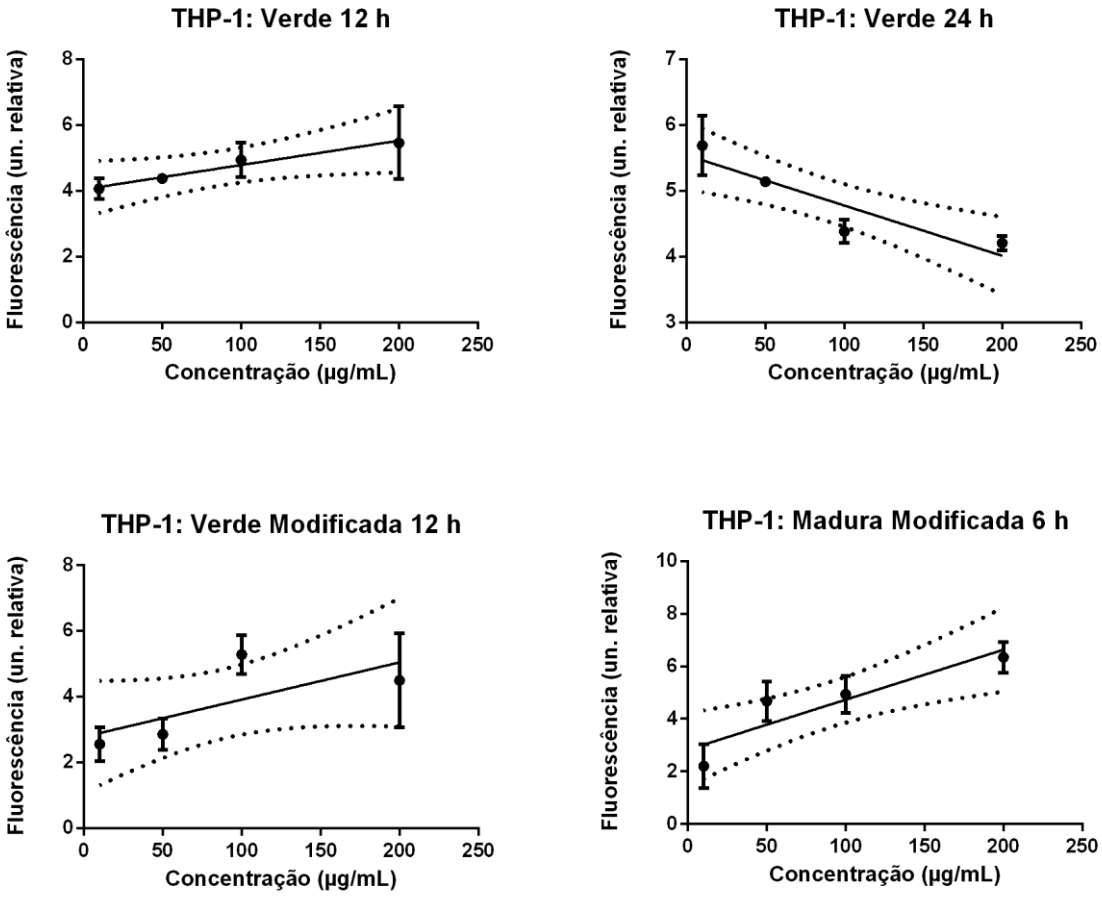

Figura 17. Relação entre produção de ERO em células THP-1 e concentração de diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. Gráficos de regressão linear ($p \leq 0,01$) com curva de tendência (linha central) de amostras que tiveram diferença estatística significante para a relação fluorescência relativa, ou seja, produção de ERO, e o aumento de concentração da amostra.

A fim de avaliar se houve correlação positiva entre a viabilidade celular por MTT e produção de ERO foi feita a análise de regressão linear, no entanto, não foi observada qualquer correlação entre as variáveis com $p \leq 0,01$, indicando que uma resposta não tem qualquer influência sob a outra.

4.6 CÉLULAS RAW 264.7

4.6.1 Viabilidade Celular por MTT

A viabilidade de células RAW 264.7 estimadas pelo ensaio com MTT mostrou que, de modo global, a viabilidade celular das amostras tratadas com as pectinas não se diferenciou daquela de células incubadas somente com meio de cultura e foi estatisticamente superior ao do grupo controle negativo, das células tratadas com triton X-100.

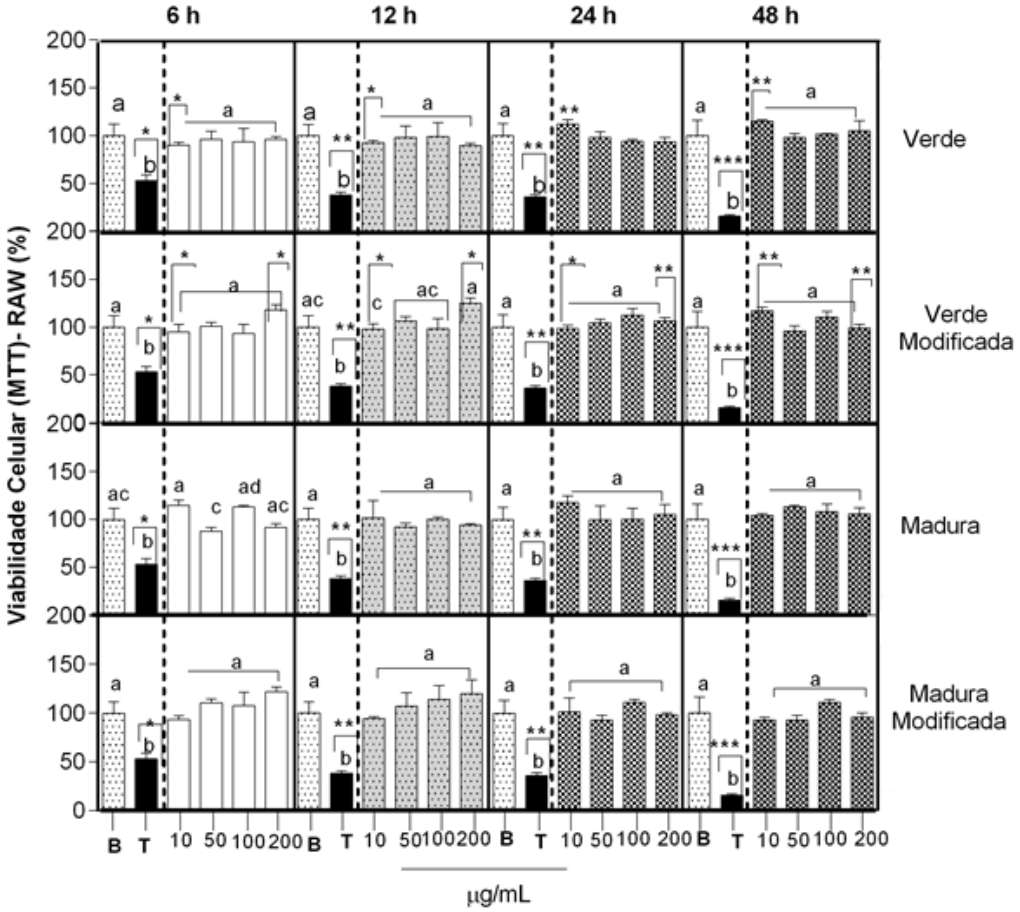

Figura 18. Viabilidade de células RAW 264.7 por MTT quando incubadas com diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. Percentual de viabilidade celular calculada em relação ao branco (células tratadas apenas com meio de cultura). Diferentes tempos de incubação (6, 12, 24 e 48 h), com as pectinas de goiaba verde, pectina modificada de goiaba verde, pectina de goiaba madura e pectina modificada de goiaba madura, em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 µg/mL). As Letras (a, b,_c) acima das barras mostram diferença estatística significante, entre as médias de um mesmo tratamento, em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 µg/mL), pelo teste de Tukey (p≤0,01) e entre um tratamento e branco e controle negativo (triton X-100). Caracteres (***; **;** +) mostram diferença estatística significante entre as médias de um mesmo tratamento e mesma concentração, porém, em diferentes tempos de incubação (6, 12, 24 e 48 h), pelo teste de Tukey (p≤0,01).

Da mesma forma que as células THP-1, as células RAW 264.7 foram avaliadas quanto a sua correlação entre a viabilidade celular e o tempo de incubação, ou seja, se com o aumento do tempo de incubação, haveria alteração da viabilidade. Como podemos observar na **FIGURA 19**, as únicas amostras cuja correlação foi positiva foram as células tratadas com pectina de goiaba verde (10 e 200 µg/mL), pectina modificada de goiaba verde (100 e 200 µg/mL), madura (50 e 200 µg/mL), e pectina modificada de goiaba madura (200 µg/mL). Com exceção das células incubadas com pectina modificada de goiaba verde e modificada de goiaba madura, todas as outras apresentaram tendência de aumento da viabilidade com o aumento da concentração das pectinas utilizadas.

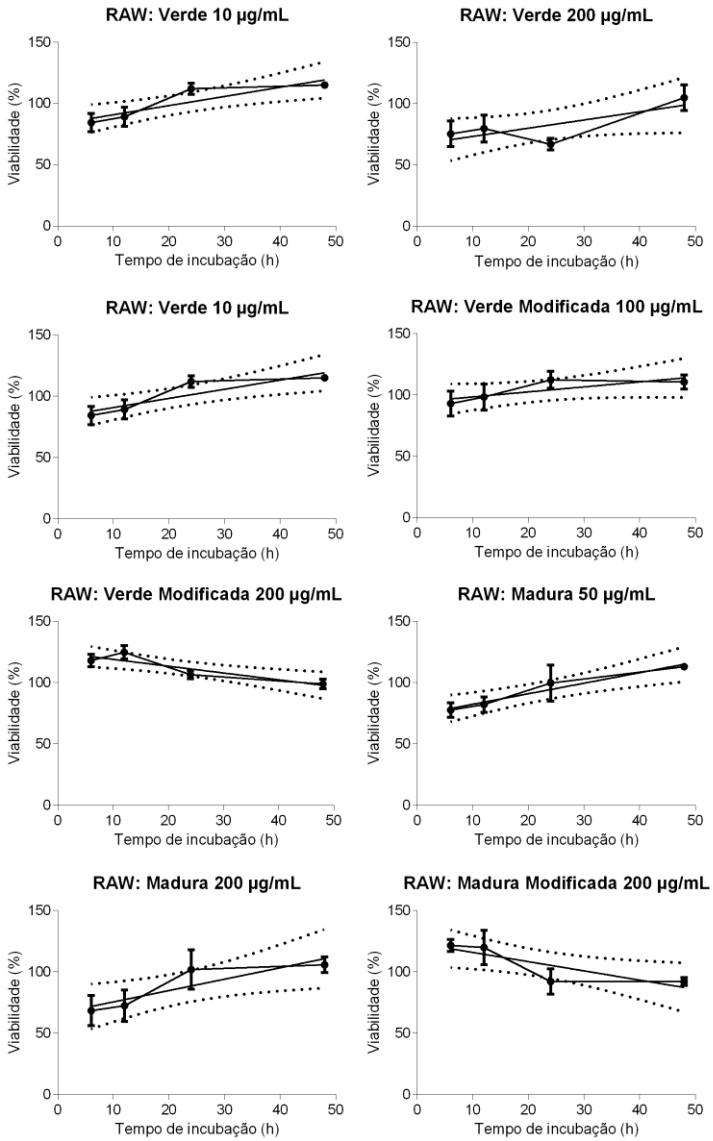

Figura 19. Relação entre viabilidade celular por MTT e tempo de incubação de diferentes pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa incubadas em células RAW 264.7. Gráficos de regressão linear (p≤0,01) com curva de tendência (linha central) em amostras que tiveram diferença estatística significante para a relação viabilidade celular e tempo de incubação.

Poucas amostras apresentaram correlação positiva entre a viabilidade celular e a concentração de pectinas como mostra a **FIGURA 20**, como é o caso da amostra de pectina de goiaba verde, pois o restante mostrou aumento da viabilidade celular com o aumento da concentração de amostra de pectina.

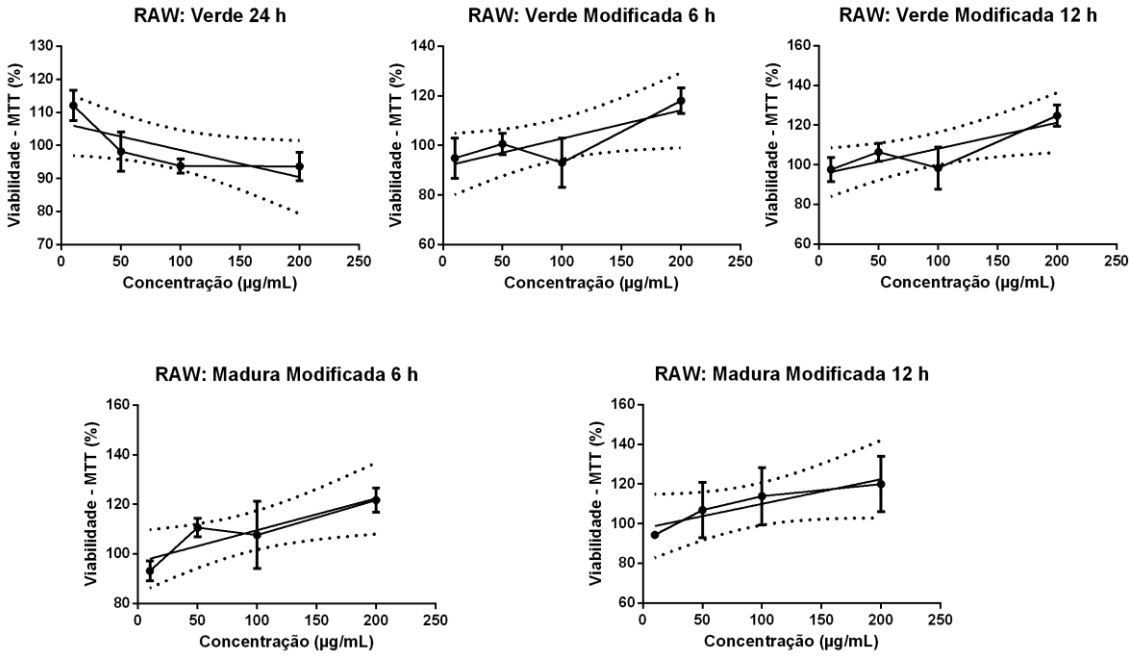

Figura 20. Relação viabilidade de células RAW 264.7 por MTT e concentração da amostra de diferentes pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. Gráficos de regressão linear (p≤0,01) com curva de tendência (linha central) em amostras que tiveram diferença estatística significante para a relação viabilidade celular com diferentes concentrações de uma mesma amostra, durante um mesmo tempo de incubação.

4.6.2 Proliferação e morte celular

Os ensaios de proliferação por contagem de células por coloração com azul de tripan e de morte celular por LDH mostraram que não houveram diferenças estatísticas entre nenhuma das amostras em seus diferentes tempos de incubação (0, 6, 12 e 48 h), com as diferentes pectinas testadas numa concentração de 200µg/mL. Também não foi detectada nenhuma toxidade para as células quando incubadas com quaisquer umas das pectinas cuja concentração utilizada foi de 200 µg/mL (**FIGURA 21 B**).

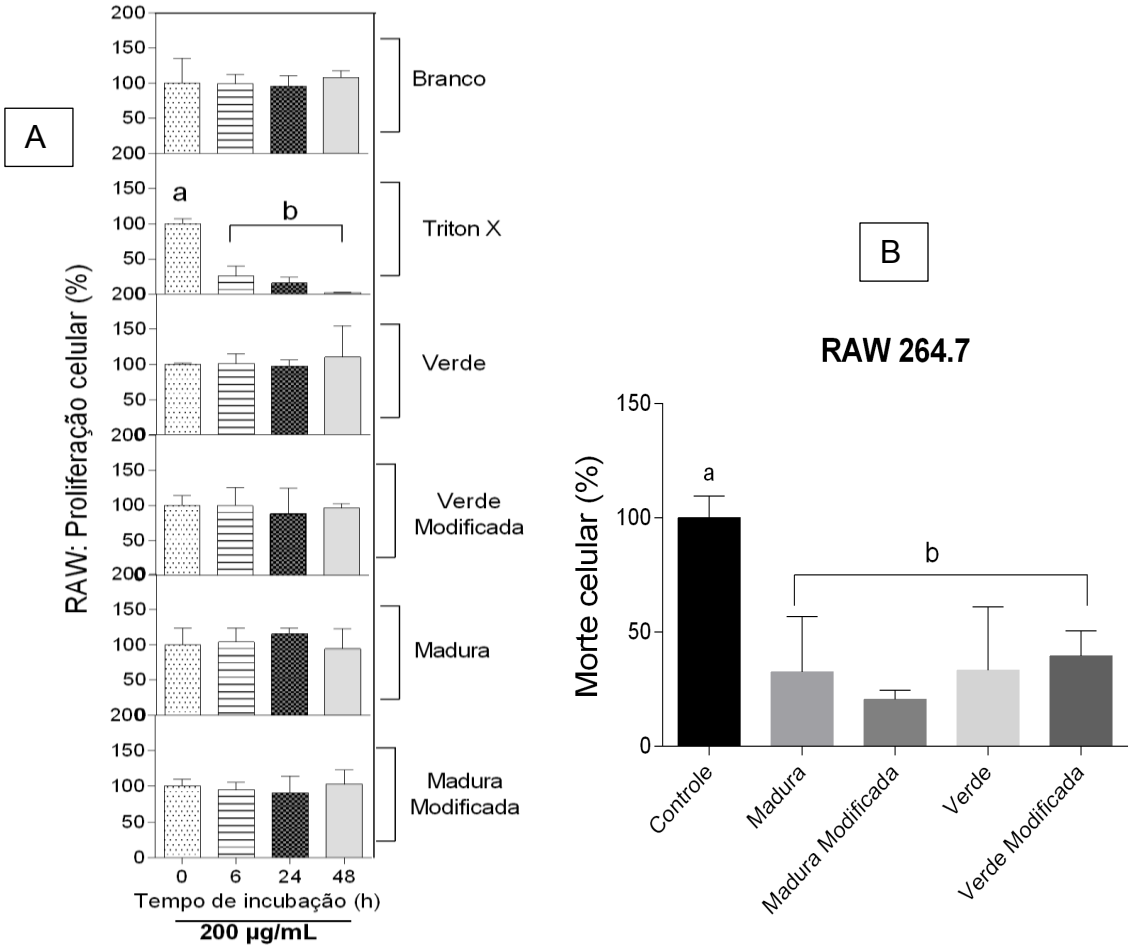

Figura 21. Avaliação da proliferação e morte de células RAW 264.7 incubadas com diferentes amostras de pectinas obtidas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. (A) Proliferação celular por coloração azul de tripan. O resultado do percentual de células viáveis foi calculado em relação às células não tratadas (tempo 0) com concentração incial de $2{,}0\times10^5$ cel/poço, em triplicata biológica e técnica. Os valores de células viáveis foram obtidos por contador automático TC-20 (BioRad). As células foram incubadas com suas respectivas pectinas com concentração de 200 µg/mL, e contadas nos tempos 6, 24 e 48 h. Foram utilizadas as pectinas de goiaba madura, pectina modificada de goiaba madura, pectina de goiaba verde e pectina modificada de goiaba verde. As letras diferentes indicam que as médias diferiram entre si estatisticamente e as letras omitidas indicam que as médias não diferiram entre si quando avaliadas pelo teste de Tukey ($p\leq0{,}01$). Barras verticais indicam o desvio padrão da média. **(B) Citotoxidade por LDH.** O percentual de morte celular foi calculado em razão ao triton X-100. Letras diferentes indicam que as médias diferiram entre si estatisticamente, letras iguais indicam que as médias não diferiram entre si. Barras verticais indicam desvio padrão da média.

4.6.7 Espécies reativas de oxigênio

Em células RAW 264.7 a produção de ERO foi maior para as células tratadas com as pectinas de goiaba verde 12 e 24 h, modificada de goiaba verde 12 h, goiaba madura 12 e 24 h e modificada de goiaba madura 12 e 24 h, pois produziram mais ERO que o grupo controle nos mesmos tempos de incubação (**FIGURA 22**).

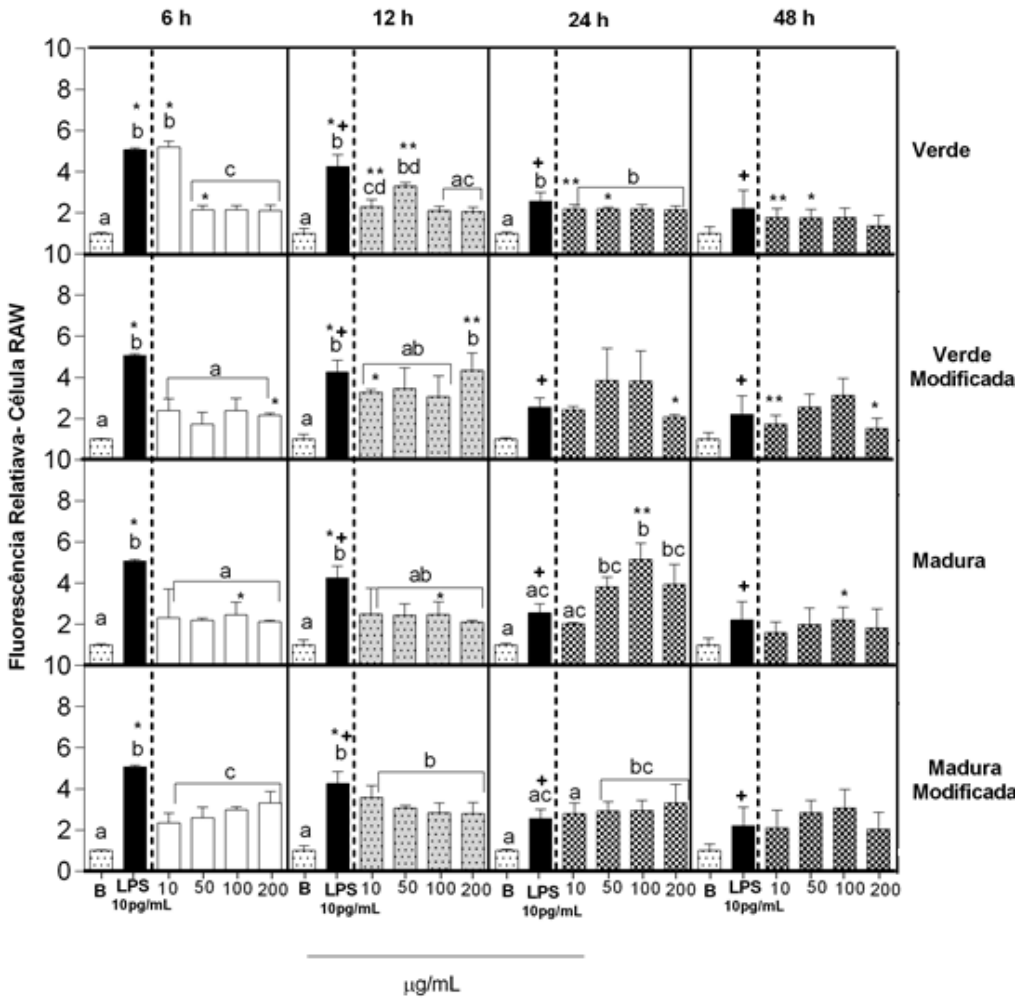

Figura 22. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células RAW 264.7 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. A fluorescência relativa em unidade relativa foi calculada em relação ao branco (células apenas com meio de cultura). As letras (a, b, c) mostram diferença estatística significante entre as médias de um mesmo tratamento (pectina de goiaba verde, pectina de goiaba madura, pectina modificada de goiaba madura e pectina modificada de goiaba verde), em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 µg/mL), pelo teste de Tukey (p≤0,01) e entre um tratamento com pectina com relação ao branco e o controle positivo, LPS (10 pg/mL). Os caracteres (***; **;** +) mostram diferença estatística significante, entre as médias de um mesmo tratamento e mesma concentração, porém em diferentes tempos de incubação (6, 12, 24 e 48 h), pelo teste de Tukey (p≤0,01). Barras verticais indicam desvio padrão da média.

Também foi observada uma tendência geral de diminuição de ERO ao longo do tempo. Porém, só as amostras de pectina de goiaba verde (10 e 200 µg/mL) e pectina modificada de goiaba verde (10 µg/mL) mostraram correlação positiva entre a produção de espécies reativas e o tempo de incubação (**FIGURA 23**).

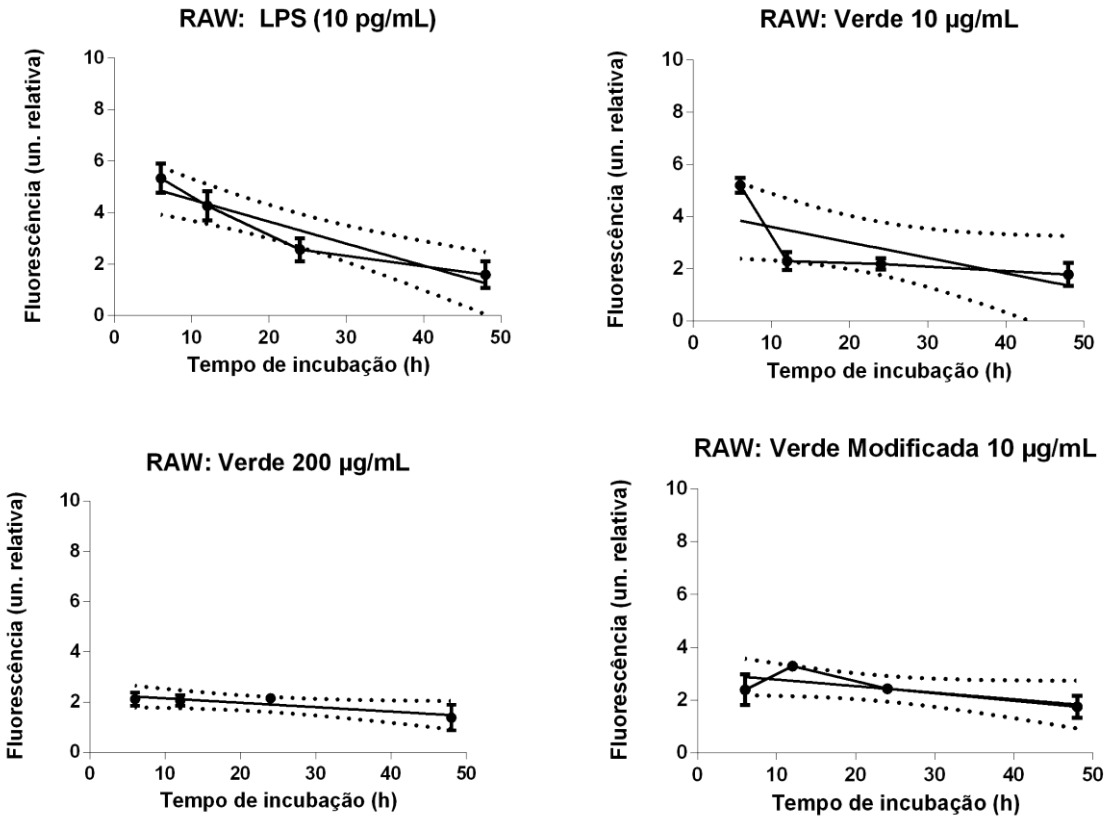

Figura 23. Relação entre produção de ERO e tempo de incubação de células RAW 264.7 tratadas com diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. A figura mostra gráficos de regressão linear (p≤0,01) com curva de tendência (linha central) em amostras que tiveram diferença estatística significante para a relação entre fluorescência relativa, ou seja, produção de ERO, e tempo de incubação.

Ao avaliar a relação entre produção de ERO em células RAW 264.7 e concentração de pectinas, apenas as amostras de pectina de goiaba verde e modificada de goiaba madura com incubação de 6 h apresentaram relação entre fluorescência relativa e concentração das amostras. A primeira decaiu com o aumento da concentração enquanto a segunda aumentou a produção de ERO com o aumento da concentração de pectinas (**FIGURA 24**).

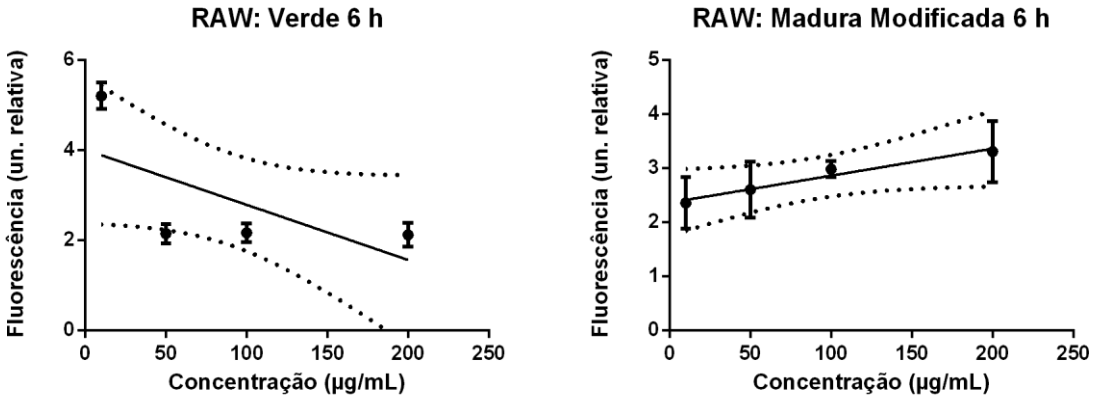

Figura 24. Relação entre produção de ERO em células RAW 264.7 e concentração de diferentes pectinas de goiabas (*Psidium guajava* L.) cv. Tailandesa. Gráficos de regressão linear (p≤0,01) com curva de tendência (linha central) de amostras que tiveram diferença estatística significante para a relação fluorescência relativa, ou seja, produção de ERO, e o aumento de concentração da amostra.

Também não houve correlação positiva entre a viabilidade celular por MTT e ERO em nenhuma das amostras, como avaliado pela análise estatística de correlação linear, mostrando que uma variável não influencia na resposta da outra.

4.6.7 Citocinas

As células THP-1 observamos a produção das citocinas IL-12, nas células incubadas com LPS, pectina modificada de goiaba verde 100 µg/mL e pectina de goiaba madura 10 µg/mL. Houve também produção de IL 1-β nas células incubadas com LPS, pectina de goiaba madura 10 µg/mL, e pectina de goiaba verde e madura 100 µg/mL. Apenas o LPS induziu produção de IL-6 pelas células (**FIGURA 25**). Apenas IL-10 não foi produzida.

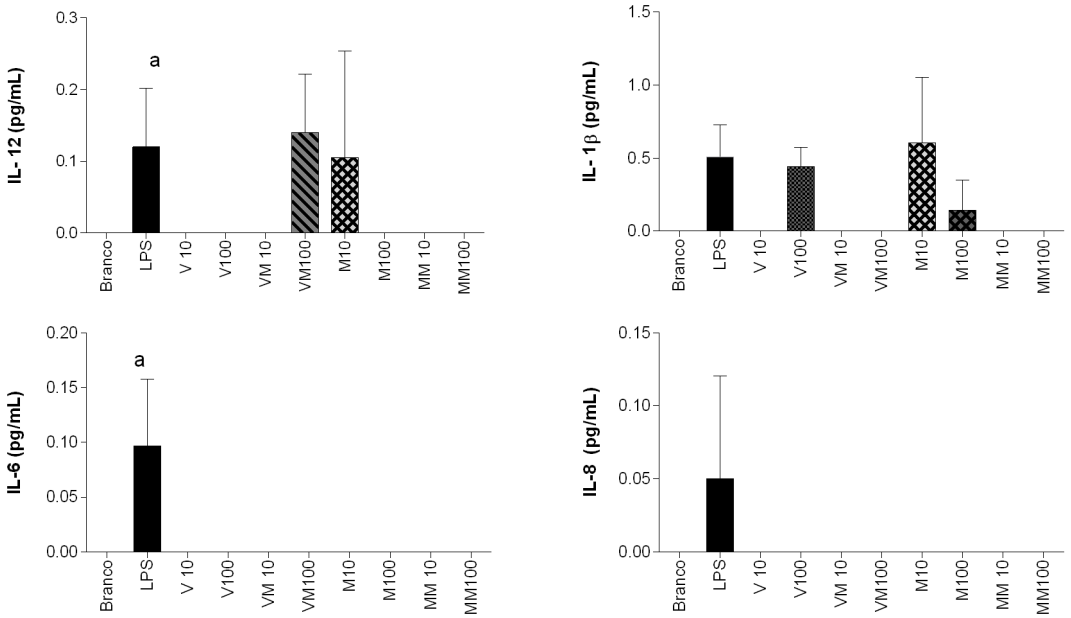

Figura 25- Interleucinas produzidas por células THP-1. Células THP-1, incubadas durante 24 h com cada um dos tratamentos (branco, LPS e pectinas). Foram avaliadas, da esquerda para a direita, a produção de interleucinas: IL-12, IL 1-β, IL-6. Letras abaixo do gráfico indicam o tratamento utilizado: LPS: lipopolissacarídeo 10 pg/mL; VM: pectina modificada de goiaba verde; M: pectina de goiaba madura; V: pectina de goiaba verde. Números depois das letras indicam a concentração em µg/mL: 10: 10 µg/mL; 100: 100 µg/mL. Caracteres omitidos indicam que as médias não diferiram estatisticamente entre si, entre os diferentes tempos de incubação, avaliadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,1$). Barras verticais indicam desvio padrão da média.

Dentre as quimicionas analisadas estão MCP-1, CXCL10, CCL5, IL-8, CXCL9. A produção de MCP-1 e IL-8, pelas células incubadas com pectina não diferiu estatisticamente da produção de células sem tratamento ou com LPS, enquanto que para CXCL10 e CXCL9, apenas células incubadas com pectina de goiaba madura na concentração de 100 µg/mL, tiveram produção dessas quimicinas quando comparadas a todos os outros tratamentos (**FIGURA 26**). No entanto, em nenhum tratamento houve produção de TNF-α.

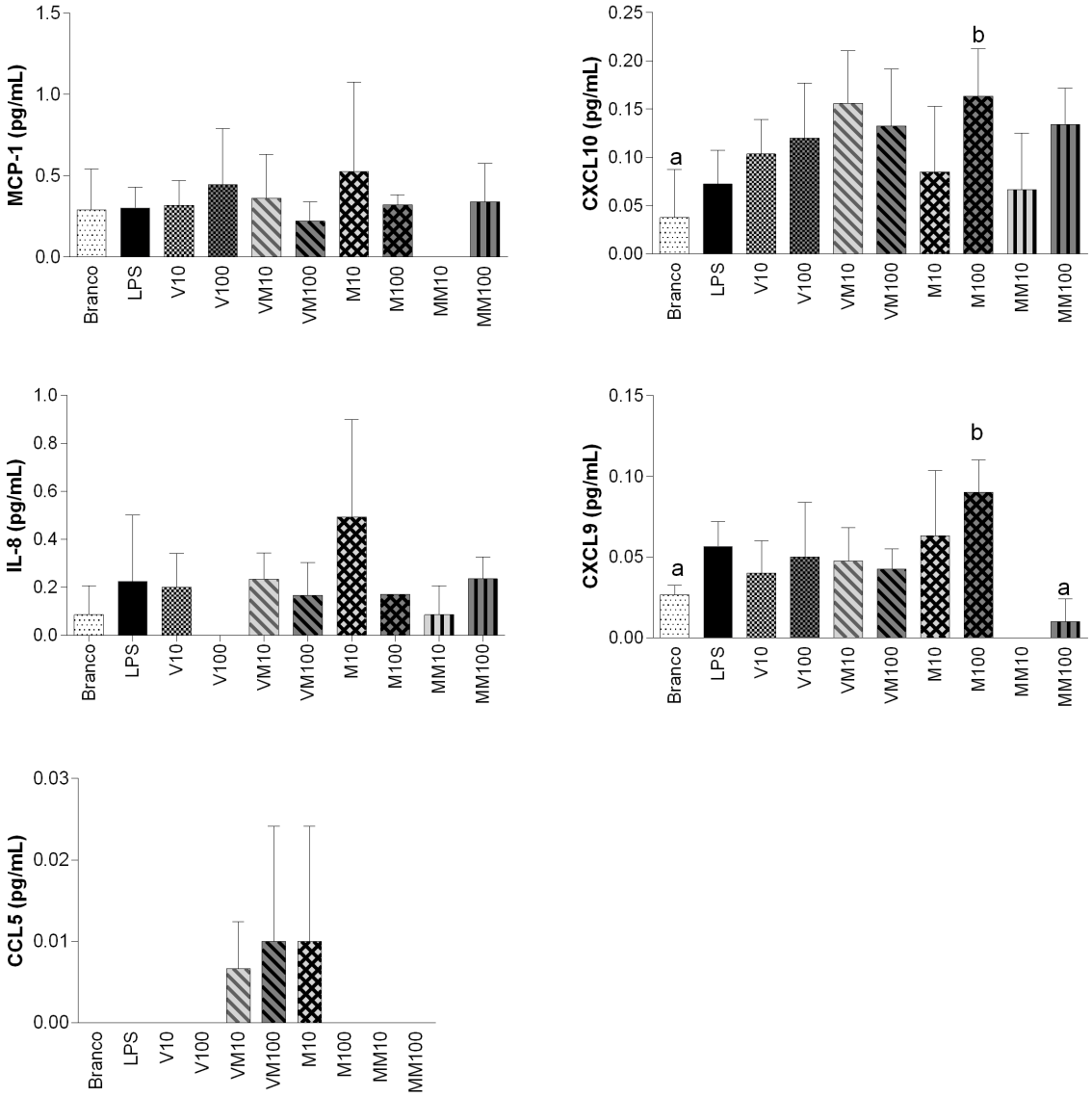

Figura 26. Quimiocinas produzidas por células THP-1. Células THP-1 foram incubadas durante 24 h com cada um dos tratamentos (branco, LPS e pectinas). Foram avaliadas, da esquerda para a direita, a produção de MCP-1; CXCL10; CCL5; IL-8; CXCL-9 (pg/mL). Letras abaixo do gráfico indicam o tratamento utilizado: LPS: lipopolissacarídeo 10 pg/mL; V: pectina de goiaba verde ; VM: pectina modificada de goiaba verde; M: pectina de goiaba madura; MM: pectina modificada de goiaba madura . Números depois das letras indicam a concentração em µg/mL: 10: 10 µg/mL; 100: 100 µg/mL. Letras acima da barra: letras diferentes indicam que as médias diferiram estatisticamente entre si, letras omitidas, significando que as médias são estatisticamente iguais pelo teste Tukey ($p \leq 0,1$). Barras verticais indicam desvio padrão da média.

Já as células RAW 264.7, **FIGURA 27**, quando expostas aos diferentes polissacarídeos de goiabas, produziram CCXL10 (apenas pectina modificada de goiaba verde 10 µg/mL), TNF- α (maior quantidade para pectina de goiaba verde 100 µg/mL e madura 10 µg/mL, o restante não diferiu do grupo controle e LPS) e

MCP-1 (goiaba verde 100 µg/mL, modificada de goiaba verde 100 µg/mL e madura 10 µg/mL, foram as que mais produziram essa quimiocina). Não houve produção de IFN-γ IL-6, IL-10 e IL- 12p70.

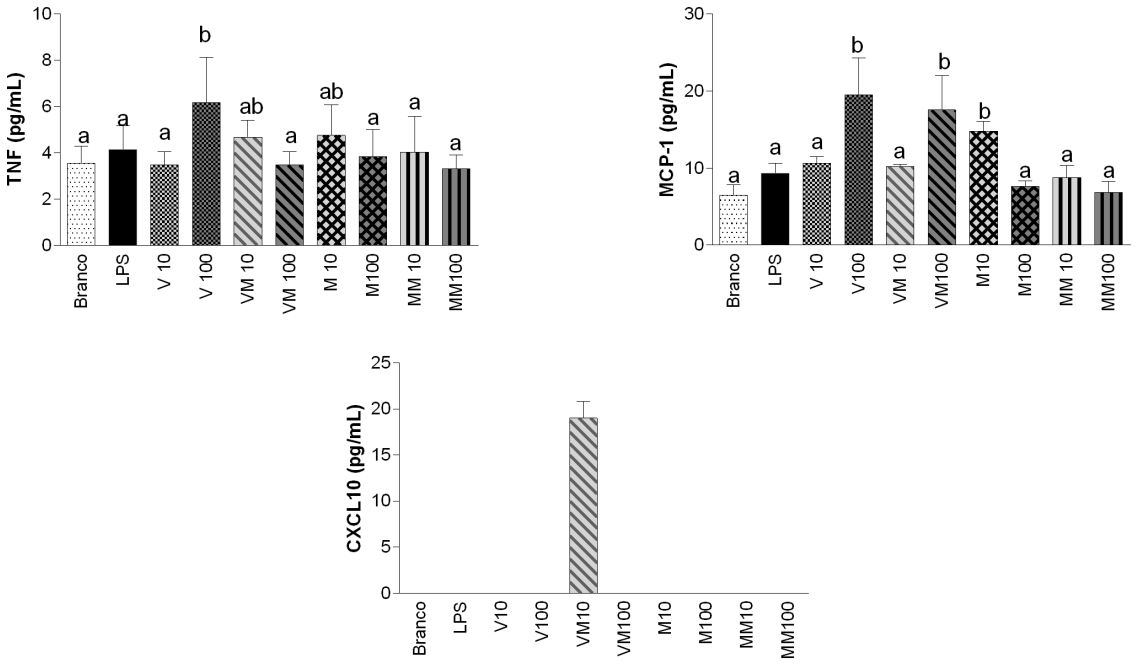

Figura 27. Citocinas produzidas por células RAW 264.7. Células RAW 264.7 foram incubadas durante 24 h com cada um dos tratamentos. Foram avaliadas, da esquerda para a direita, a produção de CXCL10; TNF; MCP-1 (pg/mL). Letras abaixo do gráfico indicam o tratamento utilizado: LPS: lipopolissacarídeo 10 pg/mL; V: pectina de goiaba verde; VM: pectina modificada de goiaba verde; M: pectina de goiaba madura; MM: pectina modificada de goiaba madura. Números depois das letras indicam a concentração em µg/mL: 10: 10 µg/mL; 100: 100 µg/mL. Letras acima da barra: letras diferentes indicam que as médias diferiram estatisticamente entre si, letras omitidas, significando que as médias são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p \leq 0,1$). Barras verticais indicam desvio padrão da média.

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTOS

Durante o desenvolvimento ocorre uma série de reações físico-químicas que culminam no amadurecimento. Dentre elas podemos citar as alterações de cor, textura, perda de massa, produção de etileno e aumento da taxa respiratória.

Em goiabas há intensa atividade enzimática sob os pigmentos presentes nos frutos. Sabe-se que na casca há ação da clorofilase sob a clorofila, que degrada a cor verde escura em amarelo. Já na polpa, a cor vermelha se acentua devido à biossíntese de carotenoides (acumulando nos plastídios, em especial o β-caroteno, licopeno e a xantofila) e de compostos fenólicos como os flavonoides, promovendo, portanto, o aumento da cromaticidade (SIQUEIRA et al., 2011; SETIAWAN, 2001; AZZOLINI; JACOMINO; BRON, 2004).

A perda da firmeza do fruto, ou textura, diminui progressivamente à medida que a maturação progride, evidenciando o amadurecimento que se dá pela alteração da estrutura e composição da parede celular, mediada pela ação de enzimas hidrolíticas, como a poligalacturonase (PG), celulase e pectinametilesterase (PME) e pela solubilização dos polissacarídeos estruturais, como a pectina e a celulose, e também do amido (JAIN et al.,2001; CHITARRA; CHITARRA, 2005; PERONI-OKITA et al., 2010). Associadamente, temos a perda de massa, ocasionada tanto pela perda de água, devido à respiração e transpiração, quanto pela solubilização das protopectinas (MAGUIRE, 2000 YAMASHITA; BENASSI, 2000).

O fitorregulador etileno, hormônio vegetal que se apresenta no estado gasoso, é apontado como o principal responsável por iniciar e controlar o amadurecimento da fruta, pois, ao se ligar a receptores celulares, desencadeia uma série de eventos enzimáticos que degradam a parede celular e alteram a cor e a firmeza do fruto (PEROTTI, MORENO, PODESTÁ, 2014; ARGUESO et al., 2007; SRIVASTAVA; HANDA, 2005).

A respiração, avaliada pela a produção de CO_2, é um processo importante haja vista que várias reações estão acopladas a esse processo. Durante o metabolismo respiratório ocorrem sínteses de diversos compostos como pigmentos, fenólicos e fitormônios, além da geração de substratos, como açúcares ácidos orgânicos e lipídeos. A atividade respiratória provoca profundas modificações dos constituintes químicos, o que interfere na qualidade e, portanto, é mais um

parâmetro para avaliar o amadurecimento e o desenvolvimento da fruta (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 2012; CERQUEIRA, 2007).

Com o desenvolvimento do fruto, há também uma mudança na quantidade de açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose), responsáveis pelo sabor doce das frutas. Eles atingem seu pico na maturidade, logo, é frequentemente utilizado como índice para avaliar o amadurecimento do fruto (DESNOUES et al., 2014; GOMEZ; LAJOLO; CORDENUNSI, 2002).

O aumento de frutose e sacarose nos frutos maduros pode ser justificado pela hidrólise de polissacarídeos da parede celular (GOMEZ; LAJOLO; CORDENUNSI, 2002). Enquanto que para a glicose (segundo mais abundante) há um decréscimo significativo que pode ser explicado por sua utilização na respiração (MENDONÇA et al., 2007; SOARES et al., 2007; RASHIDA; EL FADIL; EL TINAY, 1997).

No entanto, em outras cultivares a quantidade desses açúcares pode variar, inclusive em algumas delas há presença de amido (MENDONÇA et al., 2007; LEE et al., 2010; BASHIR; ABU-GOUKH, 2003), diferente do observado neste estudo, mostrando que as diferentes variedades podem possuir características químicas únicas.

5.2. PROTEÍNAS, PIGMENTOS E COMPOSTOS FENÓLICOS

Componentes estruturais vegetais podem estar associados a, por exemplo, proteínas e compostos fenólicos, que dentre outras funções exercem atividades biológicas, interferindo, inclusive, nas atividades e respostas celulares (CUMMINGS; STEPHEN, 2007; DALLA NORA et al., 2014; FLORES et al., 2015).

Em goiabas, com o desenvolvimento do fruto há um aumento dos teores de proteínas (BASHIR; ABU-GOUKH, 2003) e da biossíntese de compostos fenólicos, como os flavonoides, especialmente as antocianidinas (SIQUEIRA et al., 2011; SETIAWAN, 2001) e as proantocianidinas, como os taninos (DALLA NORA et al., 2014; FLORES et al., 2015). Por fim, há também a lignina, que embora seja um complexo molecular constituído predominantemente de anéis aromáticos, é classificado como fibra alimentar (SPILLER, 2001).

Durante a extração de pectinas, o uso de clorofórmio, metanol e acetona durante a extração promovem a inativação enzimática e a desnaturação e coagulação proteica (FIC et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2007;

TANTIPAIBOONWONG et al., 2005; BOTELHO et al., 2010). As altas temperaturas (70º C) expõem os grupos não polares (hidrofóbicos) das proteínas causando agregação, precipitação, diminuição da solubilidade e desnaturação (PEREDA, 2005; LIU, 2012).

Com relação aos pigmentos, a clorofila, os carotenoides, alguns compostos fenólicos e seus produtos de degradação podem ser removidos por solventes orgânicos como acetona, metanol, etanol e acetato de etila, que são mais polares, (SCHIOZER; BARATA, 2013; LIMA et al., 2011).

Os flavonoides podem ser removidos por PVP, já que interagem diretamente com os anéis aromáticos (DURÁN-LARA et al., 2015). Já os taninos sofrem degradação promovida pelo TGA (TAMIR; NACHTOMI; SCHIOZER, 1971; ROUMEAS et al., 2013).

Portanto, todas essas etapas que foram empregadas nesse estudo promoveram não só a extração de pectinas, mas também a purificação desse polissacarídeo com a remoção de outras moléculas associadas e que podem ser interferentes nos ensaios com células.

A lignina, presente principalmente em caules, sementes e farelos, é um polímero especialmente insolúvel. No entanto, ao se utilizar apenas a FSA, e eliminar as sementes nas primeiras etapas e não incluir ácidos e bases fortes durante a extração, as condições não foram favoráveis a que estes compostos estivessem presentes. De fato, a presença de ligninas não foi detectada no teste de Folin- Ciocalteau (OLIVEIRA, 2015; ALAMAR, 2012).

5.3 COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES, OLIGOSSACARÍDEOS E TAMANHO MOLECULAR

Os processos de amadurecimento e modificações químicas podem alterar as características dos polissacarídeos, como a composição de açúcares, peso e até mesmo seu rearranjo molecular (MANRIQUE; LAJOLO, 2002; GOULAO; OLIVEIRA, 2008).

A pectina é um heteropolissacarídeo que contém predominantemente resíduos de GalA. Quando presentes, os açúcares neutros como Ara, Fuc, Gal, Gli, Man e Xyl, ocorrem nas cadeias laterais ou incorporados à cadeia principal. (CUMMINGS; STEPHEN, 2007; CUMMINGS; STEPHEN, 2007).

O tamanho dos polissacarídeos pode variar. Eles geralmente ocorrem como polidispersos, sem uniformidade de peso. Os compostos de alto peso molecular são formados pela junção de monossacarídeos ou seus derivados, oligossacarídeos, unidos através de polimerização, por ligações glicosídicas, levando a propriedades físico-químicas nitidamente distintas daquelas diferentes dos monômeros que os originaram (ROBYT, 1998, KURITA; FUJIWARA; YAMAZAKI, 2008).

Os oligossacarídeos e açúcares livres presentes são decorrentes de processos de despolimerização via ação enzimática durante a maturação dos frutos. Nesse processo, diversas enzimas são ativadas promovendo a solubilização da parede celular, por meio de processos degradativos como a clivagem de ligações e desesterificação de grupos, ocasionando, inclusive, a perda de açúcares neutros e um rearranjo de suas associações (MANRIQUE; LAJOLO 2002; SILA et al., 2008. KURITA; FUJIWARA; YAMAZAKI, 2008).

Em goiabas, observamos que além das alterações de cor, textura e perda de massa, decorrentes ao amadurecimento, houve também alterações do peso molecular das pectinas. A pectina dos frutos verdes apresentou frações de 1427, de 5 e 3 KDa, já as pectinas de frutos maduros teve peso molecular de 877, de 5 e 3 KDa, confirmando que há uma degradação dos componentes pécticos. Além disso, aparentemente, com essa despolimerização houve um aumento de monossacarídeos e oligossacarídeos nos frutos, refletindo, portanto, essas alterações nas amostras de pectinas extraídas.

Embora não se possa determinar a identidade ou a quantidade dos oligossacarídeos, foi possível identificar sua presença, especialmente nas goiabas maduras. Na literatura, os principais oligossacarídeos identificados em goiabas são os FOS – frutooligossacarídeos e os MOS – maltooligossacarídeos (SILVA, 2015; SIDDESHWAR et al., 2008).

Os FOS, que são formados por cadeias lineares de unidades de sacarose e frutose, ligadas por ligações β-1,2, tem efeito prebiótico, ou seja, promovem o crescimento das bifidobactérias do cólon humano, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, ajudando na redução da incidência de infecções gastrointestinais, e promovendo controle do apetite pelo aumento da saciedade (SILVA, 2015; KORCZAK; SLAVIN, 2018; FLORES-MALTOS et al, 2016). Por outro lado, os MOS, constituídos de manitose e glicose, ligadas por α-1, 2 ou glicose α-1,4, contribuem

para a diminuição do índice glicêmico, do colesterol plasmático, alívio de constipação e efeito bifidogênico (SILVA, 2015; QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009; SINGH et al., 2017).

Os FOS podem ter grau de polimerização (GP) variando entre 2 a mais de 60, sendo que os FOS de cadeia curta consistem inteiramente em moléculas com GP entre 3 e 5 (FDA, 2016). Já para os MOS, esse grau ainda não está bem estabelecido, mas acredita-se que seja de no mínimo 3, podendo ser maior que 12 monômeros (MEISSNER; LIEBL., 1998; MAGALHÃES 2019).

As frações de menor peso molecular das pectinas extraídas de goiabas, observados nos cromatogramas, de 3 KDa e 5 KDa, possuem respectivamente, GP 19 e GP 31. Portanto, não se pode descartar que os oligossacarídeos detectados correspondam à presença de FOS e MOS em todas as pectinas, com exceção da pectina modificada de goiaba madura.

As quebras das cadeias poliméricas podem ser decorrentes também ao uso de solventes, alterações de pH e de temperatura, especialmente em decorrência do aquecimento, como ocorre na modificação química das pectinas (KURITA; FUJIWARA; YAMAZAKI, 2008). O que se propõe é que há uma despolimerização por meio de hidrólise das ligações glicosídicas α-1,4 e uma ruptura das ligações glicosídicas β, resultante da desmetoxilação (VENZON et al., 2015; ALI. CHIN; LAZAN, 2004).

A modificação das pectinas extraídas de goiabas maduras resultou em uma diminuição de suas massas molares, pois inicialmente os pesos moleculares foram de 877, de 5 e 3 KDa e devido à modificação química, o polímero obtido apresentou 106 KDa, com perda das frações de 5 e 3 KDa. Já com as pectinas de goiabas verdes, com pesos de 1427, de 5 e 3 KDa, a despolimerização resultante da modificação levou a um polissacarídeo com peso molecular de 116 KDa, porém, sem perda das frações de 5 e 3 KDa.

Uma das alterações causadas pela modificação foi a diminuição do teor de ácido galacturônico. Esse monossacarídeo pode aumentar a fermentação (LONGSTAFF; KNOX; MCNAB, 2006; LONGSTAFF; KNOX; MCNAB, 1988) e é através desta que são produzidos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e o butirato que modulam diferentes processos no trato gastrointestinal, mediando e regulando o processo inflamatório, incluindo,

por exemplo, a produção de citocinas inflamatórias (VINOLO et al., 2011; WONG et al., 2006).

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR INFRAVERMELHO

O ATR é um método complementar em que mostra por meio de um espectro a radiação infravermelha absorvida por molécula.

A cadeia principal, composta de ácido galacturônico (GalA), tem parte de seus grupos carboxilas esterificados. Os grupos metila constituem os substituintes mais comuns e o grau de esterificação é a medida que expressa essa substituição (SRIAMORNSAK, 2003). A esterificação tem clara influência nas propriedades da pectina na capacidade da formação de gel e de atuar como espessante, e também pode estar relacionada à heterogeneidade, pH, grau de amidação, presença de açúcares e outros solutos (SRIAMORNSAK 2003; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

O grau de esterificação do metil muda conforme ocorre o amadurecimento, uma vez que há solubilização por enzimas hidrolíticas, com consequente diminuição da metilestruturação, causando mudanças drásticas na textura da parede celular e, nas propriedades mecânicas, regulando o crescimento e a forma celular (WAKABAYASHI et al., 2003; DRAYE; VAN CUTSEM, 2008; WOLF; MOUILLE; PELLOUX, 2009).

Quando essas pectinas passam por processos químicos, como a modificação, há uma mudança estrutural. As alterações na temperatura induzem alterações conformacionais e reológicas do polímero, devido à quebra de ligações, enquanto que o meio ao ser acidificado ocorre hidrólise das ligações glicosídicas α-1,4 e também desesterificação dos grupos metoxila da pectina. Já em meio alcalino, a desmetoxilação ocorre rapidamente, iniciada com a ruptura da ligação β-glicosídica no carbono 4 ao grupo carboxílico do éster (BOBBIO, 1992; COELHO, 2008; FAJARDO et al., 2012; VENZON et al., 2015).

Pectinas são classificadas como ATM (pectinas de alto teor de esterificação) quando possuem esterificação superior a 50%, e abaixo desse valor, são classificadas como BTM (baixo teor de esterificação). O grau de esterificação (GE) é uma medida proporcional de grupos metoxílicos (-CH3) ou de grupos carboxílicos

(-COO) esterificados, em relação ao total de unidades de ácido galacturônico (GAVA; DA SILVA; FRIAS, 2009; FIB, 2014).

Observamos que os processos de amadurecimento e a modificação promovem uma diminuição significativa do GE em pectinas de goiaba. Nas amostras de pectina de goiaba verde o valor do GE foi de 77,4%, para madura 62,7%, modificada verde 63,3% e modificada madura 49,1%. Exceto a pectina de goiaba madura modificada, todas são consideradas ATM.

Ao analisarmos o espectro infravermelho comprovamos a estrutura de um polissacarídeo, visto que entre 1200 e 900 cm^{-1} é onde se encontra a banda da ligação C-O-C, característica de carboidratos. Também a ligação O-H existente nas estruturas dos monossacarídeos pode ser notada em 3600 e 3000 cm^{-1} e a banda no comprimento de onda 1567 cm^{-1}, com menor intensidade, pode ser atribuído à lignina residual ligada ao polissacarídeo (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; DALONSO et al., 2009; SILVA et al., 2013).

Ainda que a lignina não tenha sido detectada pelo teste de Folin- Ciocalteau, ela pode estar condensada e ser resistente à degradação (SALIBA et al., 2001).

Apesar de ser utilizada como auxiliar na identificação de carboidratos, há dados conflitantes na literatura e até o momento não há uma biblioteca para carboidratos, essencial para a identificação dos mesmos, mas ainda assim pode ser importante para confirmar as estruturas observadas por outros métodos.

5.5 ENDOTOXINAS

As endotoxinas, tais como o LPS, estão presentes na membrana externa na maioria das bactérias Gram-negativas e esse componente celular pode desencadear respostas biológicas pronunciadas relacionadas a efeitos inflamatórios (HARM; GABOR; HARTMANN, 2016) e, portanto, devem ser eliminadas das amostras.

A fim de garantir sua eliminação, utilizou-se colunas com o antibiótico PmB imobilizado em resina (MAMAT et al., 2013). A PmB se liga à porção lipídica do LPS e permite sua remoção do material, o que o impede de estimular a secreção de fatores imunológicos como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e ERO, uma vez que ela desagrega a endotoxina em complexos menores diminuindo sua toxicidade.

Após a purificação, foi realizado o teste LAL para quantificar endotoxinas nas preparações de pectinas e os resultados revelaram ausência de contaminação das amostras.

5.6 VIABILIDADE CELULAR POR MTT, AZUL DE TRIPAN E CITOTOXIDADE POR LDH

Este teste colorimétrico é um indicativo indireto da viabilidade celular. Basicamente, as desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente viáveis reduzem o MTT, sal solúvel, de cor amarela, à formazan, cristal insolúvel de cor púrpura. Este ensaio tem como premissa que apenas células viáveis são capazes de reduzir e converter o composto MTT em formazan. (MORGAN, 1998; VISTICA et al., 1991).

Como controles dos ensaios, as células foram tratadas com o meio de cultura apenas, considerado o branco (sem tratamento), e triton X-100, que promove lise celular (KOLEY; BARD, 2010), para testar a resposta das células. Os resultados foram calculados com relação às células do grupo branco, ou seja, não tratadas, já que estas não sofreram danos ou estímulos (CHANG; LIN; WANG, 1993).

Através do ensaio de viabilidade por MTT, observamos padrões inconsistentes, especialmente para as células THP-1 que apresentaram resultados bastante variáveis. Na tentativa de melhor investigar esses resultados, foram feitos testes estatísticos de regressão linear, os dados de viabilidade celular foram associados ao tempo de incubação, em uma mesma concentração, e a viabilidade celular à produção de ERO. Os resultados apresentados mostraram que apenas as células de algumas condições testadas tinham a viabilidade alterada devido ao tempo de exposição e ao aumento de concentração das pectinas. Entretanto, não houve associação positiva com relação às ERO e a viabilidade.

Esses dados mostram que a produção de ERO não teve qualquer influência nos resultados promovendo a oxidação do MTT. Entretanto, a viabilidade celular pode ser alterada por algumas das amostras utilizadas em determinadas concentrações, aumentando ou diminuindo a viabilidade celular, seja por diminuição do metabolismo ou por morte celular. De modo contrário ao MTT, o ensaio por LDH mostrou que nenhuma das amostras na maior concentração utilizada foi citotóxica, o

que pode indicar uma falta de acuracidade do método por MTT na avaliação da viabilidade.

Na literatura, alguns autores apresentam argumentos que reforçam essa possibilidade. Há sugestões de que o mesmo pode ser afetado por ERO, ou outros processos redox (SOENEN e DE CUYPER, 2009), pela dependência de lipídios intracelulares para o armazenamento de formazano (DIAZ et al., 2007, STOCKERT et al., 2012), pela interação entre formazano e lipossomos (ANGIUS; FLORIS, 2015) e/ou pela interação química ou fitoquímica (HSU et al., 2003; WANG; HENNING; HEBER, 2010).

Alternativamente, alguns pesquisadores utilizam o ensaio por azul de tripan para avaliar a viabilidade celular (ALVES; GUIMARÃES, 2012; TREWYN et al., 2008). Este é um método direto, em que apenas células com membrana plasmática rompida ou não íntegra são invadidas pelo corante (STROBER, 2015) e com a instrumentação automatizada, essa técnica tem maior reprodutibilidade e eficiência (LOUIS; SIEGEL, 2011).

A princípio, o ensaio com azul de tripan foi realizado para avaliar decaimento ou proliferação celular, entretanto, este método se mostrou mais efetivo que o MTT, já que apresentou linearidade decorrente dos tratamentos, enquanto que o MTT seria mais eficiente para avaliar o metabolismo celular.

5.7 ESPÉCIES REATIVAS

As espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico (NO), hidroxila (OH), o radical superóxido (O_2^-) e radical peroxila (ROO), são moléculas instáveis e altamente reativas. Elas são produzidas pela cadeia de transporte de elétrons, na cadeia respiratória mitocondrial e são geradas principalmente durante o estresse oxidativo e exposição das células à xenobióticos (BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010; LENAZ, 2001).

Quando em baixas concentrações promovem manutenção do equilíbrio celular, pois estão envolvidas no controle da inflamação, regulação do crescimento proliferação, e apoptose celular, e produção de moléculas sinalizadoras. Porém, em excesso, apresentam efeitos prejudiciais, tais como peroxidação dos lipídios de membrana, danos no DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006), mas,

concomitantemente, podem ser benéficas na regulação metastática de células tumorais (ISHIKAWA et al., 2008).

No presente estudo, observamos que as pectinas promoveram estimulação na geração de ERO. Este ensaio, aliado ao do LDH, mostra que tal estímulo pode ser benéfico e com efeito protetor, já que a exposição à pectina não promoveu efeito citotóxico.

5.8 CITOCINAS

Para avaliação das citocinas induzidas pela exposição às pectinas, as células foram incubadas com pectinas nas concentrações de 10 e 100 µg/mL por 24 h, condições selecionadas a partir dos resultados dos ensaios de viabilidade por MTT, ensaio por azul de tripan e de produção de espécies reativas.

As células THP-1 são células de origem humana e são as mais utilizadas para investigar e estimar os efeitos de modulação envolvendo inflamação (SHIRATORI et al., 2017; BOSSHART; HEINZELMANN, 2016; CHANPUT; MES; WICHERS, 2014), enquanto que as células RAW 264.7, derivadas de camundongos BALB/c, são macrófagos originários da linhagem modificada pelo vírus da leucemia. Considerada um bom preditor da resposta imune humana, essa última é frequentemente empregada para avaliar a bioatividade de substâncias naturais e suas propriedades imunomoduladoras (TACIAK, 2018; MERLY; SMITH, 2017).

Para este estudo foram dosadas em células THP-1 as citocinas com perfil pró-inflamatório (Th1). Dentre elas, as interleucinas IL-1β, IL-6, IL-8, e IL-12, exceto a IL-10 cujo perfil é anti-inflamatório, o fator de necrose tumoral alfa, TNF-α, e as quimiocinas MCP-1/CCL2, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/ MIG e a CXCL10/IP-10. Já para as células RAW 264.7 foram dosadas as citocinas IL-6, IL-10 IL-12 e IFN-γ, TNF-α e MCP-1/CCL2.

As interleucinas desempenham atividades importantes e diversas, dentre elas a regulação de processos fisiológicos, respostas imunológicas e ação neuromoduladora, podendo, portanto, ser induzidas pela dieta a partir da modulação do sistema imune. É importante salientar que seus mecanismos de ação são complexos e que níveis de expressão moderados podem trazer benefícios ao indivíduo, no entanto, níveis excessivos ou muito restritos podem estar associados a

diversas patologias (SALAJEGHEH; 2016; ROSTENE; KITABGI; PARSADANIANTZ, 2007; DMITRIEVA et al., 2016).

Em células THP-1 as citocinas que tiveram produção significativa foram as interleucinas 1β estimuladas pelas pectinas de goiaba verde (100 µg/mL) e madura (10 e 100 µg/mL), IL-12 estimulada por pectina modificada de goiaba verde (100 µg/mL) e madura (10 µg/mL), CCL5 pelas pectinas modificadas de goiaba verde (10 e 100 µg/mL) e madura (10 µg/mL) e CXCL10 e CXCL9 por pectina de goiaba madura (100 µg/mL). MCP-1 e IL-8 não apresentaram produções significativas e para IL-10 TNFα não houve qualquer produção.

Para as células RAW 264.7 os estímulos da produção de citocinas foram significativos para IL-10 incubadas com pectina modificada de goiaba verde (10 µg/mL), TNFα pelas pectinas de goiaba verde (100 µg/mL), modificada de goiaba verde (10 µg/mL) e de goiaba madura (10 µg/mL) e MCP-1 estimulada por pectinas de goiabas verdes (100 µg/mL), modificada de goiaba verde (100 µg/mL) e goiaba madura (10 µg/mL). Não houve produção de IFNγ, IL-6 e Il-12.

Sabe-se que a alimentação tem papel não só de nutrir, mas também de ativar mecanismos de defesa, como a produção de citocinas, e manter a homeostase. Para tanto são desencadeadas várias respostas devido à interação alimento e sistema imune via intestino e pelo binômio intestino-sistema nervoso que estão totalmente conectados (CRYAN. O'MAHONY, 2011; ROUND; MAZMANIAN, 2009; BERCIK; COLLINS; VERDU, 2012). As citocinas desempenham papéis que vão além da imunidade.

A IL-1β é uma importante interleucina que atua na regulação fisiológica do sono e do apetite (KRUEGE; MAJDE, 2003; ROTHWELL; LUHESHI, 2000), ela atua em casos de infecção e estimula a imunidade adaptativa (SAHOO, 2011). Foi produzida pelas células THP-1 quando incubadas com pectinas de goiaba verde (100 µg/mL) e pectina de goiaba madura (10 e 100 µg/mL), o que pode indicar que carboidratos mais complexos (maior que 1000 kDa) influenciam na produção dessa interleucina, já que as amostras modificadas têm em sua composição a maior fração em torno de 100 KDa.

A IL-6 foi apenas produzida em células THP-1 por LPS, mas não pelas pectinas. Seu reconhecimento provoca fortes respostas pró-inflamatórias que podem

eventualmente causar uma síndrome fatal de sepse em humanos (TRIANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2002; GUHA; MACKMAN,2001).

A IL-8, também chamada de CXCL8, pode diminuir a ingestão de alimentos, em curto prazo, 2 h (PLATA-SALAMAN; BORKOSKI, 1994), controlar a inflamação intestinal (NGUYEN, 2014) e ainda induzir a secreção de TNF-α (ZHANG et al., 2005). No entanto, nenhuma das amostras induziu uma produção significativa para tal citocina em células THP-1.

A produção de IL-12 foi induzida apenas por pectina modificada de goiaba verde (100 µg/mL) e pectina de goiaba madura (10 µg/mL) em células THP-1. Tal resultado pode ser devido à similaridade entre as estruturas desses polissacarídeos, dentre as quais a que mais se destaca é o grau de esterificação (GE). O GE pode alterar características reológicas das pectinas e, portanto, suas características biológicas (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997; VERRIJSSEN et al., 2014; KITAGUCHI; YABE, 2019; WONG et al., 2017).

A IL-12 possui potente atividade antitumoral, sendo, inclusive, promissora como adjuvante contra o câncer na imunoterapia e em vacinas. Além disso, essa citocina estimula a secreção de IFN-γ (SMYTH; TANIGUCHI; STREET, 2000; COLOMBO; TRINCHIERI, 2002). Em células RAW 264.7 não houve produção de IL-12 e IFN-γ.

O Fator de necrose tumoral alfa, TNF-α, uma molécula de sinalização pertencente à família das citocinas com múltiplas funções. Pode regular processos celulares tais como diferenciação, proliferação e apoptose, pode promover a cicatrização de feridas e regular processos metabólicos promovendo a modulação da sinalização e ação da insulina e leptina no hipotálamo. Além disso, pode promover redução da ingestão alimentar e afetar o sono (BARRIEIROS et al., 2008; CAWTHORN; SETHI, 2008; ROMANATTO et al., 2007. DE SOUZA et al., 2005; TAKEHASHI et al., 1995; KRUEGE; MAJDE, 2003).

Essa molécula foi expressa apenas pelas células RAW 264.7, o que pode indicar um potencial das pectinas em induzir sua produção, já que essa célula é considerada um bom preditor da resposta imune humana (TACIAK, 2018; MERLY; SMITH, 2017).

As quimicionas são importantes elementos envolvidos nos processos fisiológicos e imunológicos. São considerados marcadores inflamatórios, porém, seu

papel no que tange processos ligados à alimentação, nutrição e patologias decorrentes, ainda não é claro (GÖGEBAKAN et al., 2015; KIRK et al., 2008; PALOMINO; MARTI, 2015; CHARO; RANSOHOFF, 2006).

A quimiocina MCP-1, proteína-1 quimioatraente de monócitos, ou, ainda, conhecida pelo seu nome sistemático CCL2, está relacionada à infiltração de macrófagos nos tecidos, que pode modular a progressão de alguns tipos de câncer (MONTI, et al., 2003; MITAL, 2019), ou ajudar na prevenção e tratamento de doenças autoimunes (KARPUS et al., 1998). Para MCP-1 a pectina modificada de goiaba madura na concentração de 10 µg/m, foi a única a não estimular a produção dessa quimiocina em células THP-1 e para RAW 264.7 não houve qualquer produção, provavelmente devido a uma baixa concentração.

A quimiocina CCL5/RANTES (Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais) é secretada por macrófagos e células T. Ela induz a migração e a ativação plaquetária e o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, o que pode ser importante em doenças inflamatórias. Estudos sugerem que essa quimiocina pode promover o aumento indireto da infiltração de macrófagos, inclusive atuando como um protetor orgânico (YU et al., 2016; ISHIDA et al, 2012; CIPITELLI, 2014). A produção de CCL5 foi estimulada apenas pelas pectinas modificadas de goiaba verde (10 e 100 µg/mL) e de goiaba madura (10 µg/mL) em células humanas. Como comentado anteriormente, esse resultado pode ser decorrente da similaridade entre as estruturas desses polissacarídeos com relação ao GE.

A CXCL9/MIG, monocina induzida pelo interferon-γ, é uma quimiocina que tem o potencial de fornecer amplificação do sinal de IFN-γ, promovendo efeito antitumoral, já que pode inibir potentemente a angiogênese e a neovascularização (BELPERIO et al., 2000; ZHANG et al., 2006). As concentrações de pectinas de goiaba madura 100 µg/mL desencadearam estímulos significativos na produção de CXCL9 e CXCL10.

A CXCL10/IP-10, proteína 10 induzida por interferon-γ é altamente inflamatória e pode promover resposta imune angiostática e antitumoral, controlando a progressão ou metástase de cânceres como o melanoma (ANTONICELLI et al., 2011; BROWNELL; POLYAK, 2013; LIU et al., 2008; ZHAO et al., 2008; GLINSKY; RAZ, 2009).

Os macrófagos são células altamente plásticas, e sua polarização se dá através do estímulo ambiental, dada a exposição a agentes endógenos ou exógenos, incluindo compostos alimentares. Em ambiente ou exposição a estímulos inflamatórios, essas células adquirem fenótipo M1, desencadeando uma resposta inflamatória através da liberação de citocinas do tipo Th1 (AMBARUS et al., 2012; WANG; LIANG; ZEN; 2014; MOSSER, 2003).

De modo geral, observamos que as pectinas de goiaba podem promover um ambiente e estímulo pró-inflamatório. Com exceção da IL-10, outras citocinas anti-inflamatórias não foram dosadas, mas sua não expressão pode ser uma evidência que reafirma a aparente predisposição das pectinas de goiaba em tornar o microambiente pró-inflamatório.

O estudo de Burana-Osota e colaboradores (2009) mostrou que polissacarídeos solúveis em água provenientes de goiabas de modo geral, estimularam a proliferação de linfócitos T e aumentaram a expressão do marcador CD69, que modula a função linfocitária, exercendo efeitos pró-inflamatórios (ZIEGLER; RAMSDELL; ALDERSON, 1994). Foram também evidenciados os efeitos antineoplásicos de extratos provenientes da polpa de goiabas, acompanhada de ativação de uma série de proteínas pró-inflamatórias (BONTEMPO et al., 2012).

Entretanto, estudos que evidenciam a capacidade anti-inflamatória de goiabas, tanto dos frutos quanto das folhas, estão associados aos seus compostos antioxidantes (FLORES et al., 2013; DENNY et al., 2013; KIM et al., 2015; LAILY et al., 2015; MANOSROI et al., 2006).

A IL-10 não foi produzida pelas células THP-1, entretanto em células RAW 264.7 houve produção induzida por pectina modificada de goiaba verde (10 µg/mL), o que pode indicar um potencial de regulação homeostática dessa pectina em baixa concentração. A IL-10 ela está envolvida em processos anti-inflamatórios, por exemplo, impedindo a resistência à insulina induzida por lipídios. Pois seus níveis circulantes são menores pacientes obesos (HONG, 2009).

Resumidamente, as pectinas de goiaba que induziram produção celular de citocinas de modo significativo foram as pectinas de goiaba verde na concentração de 100 µg/mL e as pectinas de goiaba madura e modificada verde nas concentrações de 10 e 100 µg/mL. De fato, esse é um resultado concordante com a literatura, que mostra que polissacarídeos vegetais contendo arabinose, galactose e

xilose podem promover ação imunomoduladora (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; PAULSEN, 2001; TABARSA et al, 2018).

A pectina modificada de goiaba madura não promoveu indução expressiva de qualquer uma das citocinas, o que pode ser em decorrência da sua estrutura. Essa pectina foi a única das amostras testadas a não apresentar polímeros de 5 e 3 KDa, que supostamente sejam os FOS e os MOS. Essa pectina, no entanto, mostrou potencial na indução da quimiocina CXCL10 em células THP-1. Pectinas modificadas são amplamente conhecidas pelo seu potencial antitumoral e tal quimiocina está diretamente ligada a esses mecanismos (ZHAO et al., 2008; GLINSKY; RAZ, 2009).

Para as diferentes pectinas de goiaba analisadas os benefícios do seu consumo parecem ir muito além das ações descritas na literatura, como formação de géis, aumento do bolo fecal e produção de ácidos graxos de cadeia curta pela fermentação bacteriana. Especialmente as pectinas de goiaba verde, modificada de goiaba verde e pectina de goiaba madura têm grande potencial imunomodulador, se estendendo à regulação neuroendócrina, através da indução da produção de ERO e citocinas, sem causar, no entanto, citotoxidade, dadas as concentrações utilizadas nesse estudo.

Como observado, as pectinas obtidas de goiabas tem grande potencial imunomodulador. Acredita-se que apenas um subconjunto de citocinas liberadas durante processos patológicos pode participar de processos de regulação e imunomodulação (PLATA-SALAMAN; BORKOSKI, 1994). No entanto, são necessárias mais investigações no que tange a estrutura e seus mecanismos celulares. Além disso, investigações in vitro são os primeiros passos de uma série de estudos que devem ser feitos para comprovar tais benefícios.

6 CONCLUSÃO

Dados deste estudo mostram que as pectinas de goiaba podem modular os macrófagos promovendo um perfil mais pró-inflamatório, com base no conjunto de citocinas avaliadas e ERO. Dentre as frações testadas, as mais promissoras foram as pectinas de goiaba verde na concentração de 100 µg/mL, pectina modificada de goiaba verde e pectina de goiaba madura nas concentrações de 10 e 100 µg/mL. Já as pectinas modificadas de goiaba madura mostraram efeito sugestivo de que pode haver um potencial anticarcinogênico.

Esses resultados são promissores e justificam estudos em outros modelos celulares e em maiores concentrações, além de investigações voltadas para os aspectos estruturais dos polissacarídeos, seus mecanismos de ação e, principalmente, ensaios *in vivo* para que seus eventuais benefícios na modulação imune possam ser comprovados.

4 REFERÊNCIAS

ABREU, J. R. et al. Sugar fractionation and pectin content during the ripening of guava cv. Pedro Sato. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 1, p. 156-162, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2010. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 45, de 03 de novembro de 2010**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/rdc0045_03_11_2010.html>.

ALAMAR, P. A. Caracterização do perfil de fibras em resíduos agroindustriais amazônicos e de sua capacidade de adsorção seletiva. 2015. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará.

ALI, Z. M.; CHIN, L. H; LAZAN, H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. **Plant Science**, v. 167, n. 2, p. 317-327, 2004.

ALVES; GUIMARÃES, 2012 in: MOLINARO, E. M. et al. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v. 5. 2012.

AMALIYA, A.; RISDIANA, A. S.; VAN DER VELDEN, U. Effect of guava and vitamin C supplementation on experimental gingivitis: A randomized clinical trial. **Journal of clinical periodontology**. v. 45, n. 8, p. 959-967, 2018.

AMARAL DA SILVA, A.; CALDERON GONÇALVES, R. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ci. Rural**, 2010.

AMBARUS, C. A. et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. **Journal of immunological methods**, v. 375, n. 1-2, p. 196-206, 2012.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). **THP1 (ATCC® TIB202™)**. 2017. Disponível em: <https://www.atcc.org/~/ps/TIB-202.ashxhttps://www.atcc.org/~/ps/TIB-202.ashx>.

AMIN, I. et al. Oligopeptide patterns produced from Theobroma cacao L of various genetic origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 7, p. 733-737, 2002.

AMORIM, J. C. et al. Modified pectin from Theobroma cacao induces potent pro-inflammatory activity in murine peritoneal macrophage. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 1040-1048, 2016.

ANGIUS, F.; FLORIS, A. Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 2, p. 314-319, 2015.

ANTONICELLI, F. et al. CXCL10 reduces melanoma proliferation and invasiveness in vitro and in vivo. **British Journal of Dermatology**, v. 164, n. 4, p. 720-728, 2011.

ARGUESO, C. T.; HANSEN, M.; KIEBER, J. J. Regulation of ethylene biosynthesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 2, p. 92-105, 2007.

AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2004.

BARBALHO, S. M. et al. Psidium guajava (Guava): A plant of multipurpose medicinal applications. **Med Aromat Plants**, v. 1, n. 104, p. 2167-0412.1000104, 2012.

BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

BASHIR, H. A.; ABU-GOUKH, A. B. A. Compositional changes during guava fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 557-563, 2003.

BELPERIO, J. A. et al. CXC chemokines in angiogenesis. **Journal of leukocyte biology**, v. 68, n. 1, p. 1-8, 2000.

BERCIK, P.; COLLINS, S. M.; VERDU, E. F. Microbes and the gut-brain axis. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 24, n. 5, p. 405-413, 2012.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 151p, 1992.

BONTEMPO, P. et al. Psidium guajava L. anti-neoplastic effects: induction of apoptosis and cell differentiation. **Cell proliferation**, v. 45, n. 1, p. 22-31, 2012.

BOSSHART, H.; HEINZELMANN, M. THP-1 cells as a model for human monocytes. **Annals of translational medicine**, v. 4, n. 21, 2016.

BOTELHO, D. et al. Top-down and bottom-up proteomics of SDS-containing solutions following mass-based separation. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 6, p. 2863-2870, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROWNELL, J.; POLYAK, S. J. Molecular pathways: hepatitis C virus, CXCL10, and the inflammatory road to liver cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 6, p. 1347-1352, 2013.

BUONOCORE, G. E.; PERRONE, S.; TATARANNO, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. In: **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. WB Saunders, 2010. p. 186-190.

BURANA-OSOT, J. et al. Characterisation and immuno-stimulating activity of polysaccharides from Thai medicinal plants. **Natural product research**, v. 24, n. 15, p. 1403-1412, 2010.

BUTTRISS, J.; STOKES, C. Dietary fibre and health: an overview. **Nutr Bull**, v. 33, n. 3, p. 186–200, 2008.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009.

CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. et al. Stress modulates intestinal secretory immunoglobulin A. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 7, p. 86, 2013.

CANTERI, M. H. G et al. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 22, n. 2, 2012.

CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF-α and adipocyte biology. **FEBS letters**, v. 582, n. 1, p. 117-131, 2008.

CERQUEIRA, T. S. et al. Controle do amadurecimento de goiabas' Kumagai'tratadas com 1-metilciclopropeno. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 687-692, 2009.

CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. **International immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 37-45, 2014.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v. 354, n. 6, p. 610-2, 2006.

CHITARRA, M. I. F. CHITARRA, A. B. **Pós--Colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras: UFLA, 785p. 2005.

CIPITELLI, M. C. et al. Efeito das Quimiocinas na alteração da permeabilidade de células endoteliais na dengue. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto Oswaldo Cruz.

COELHO, M. T. **Pectina**: Características e aplicações em alimentos. Disciplina de Seminário de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 2008.

COLLINS, S. M.; BERCIK, P. Gut microbiota: Intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 6, p. 326, 2013.

COLOMBO, M. P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 13, n. 2, p. 155-168, 2002.

CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 43, n. 2, p. 347-351, 1995.

CORDENUNSI, B. R.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (Musa acuminata L.: cvs Mysore and Nanicão). **Carbohydrate polymers**, v. 71, n. 1, p. 26-31, 2008.

CRYAN, J. F.; O'MAHONY, S. M. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 3, p. 187-192, 2011.

CUMMINGS J; MANN J. **Essentials of human nutrition**. Oxford University Press, 2017.

CUMMINGS, J. H.; STEPHEN, A. M. Carbohydrate terminology and classification. **European journal of clinical nutrition**, v. 61, n. S1, p. S5, 2007.

CUMMINGS, J. H. et al. Passclaim 1—gut health and immunity. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 2, p. ii118-ii173, 2004.

DA CRUZ, J. N. et al. Isolation and biochemical characterisation of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from the enzymatic hydrolysis of cupuassu seed protein isolate. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 104-114, 2016.

DA SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases of large animals. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994-1003, 2010.

DALLA NORA, C. et al. Effect of processing on the stability of bioactive compounds from red guava (Psidium cattleyanum Sabine) and guabiju (Myrcianthes pungens). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, n. 1, p. 18-25, 2014.

DALONSO, N. et al. Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (Allium sativum L.): proposta de metodologia alternativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 793-797, 2009.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2018.

DE SOUZA C. T., et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, p. 4192–4199, 2005.

DENARDO, D. G.; RUFFELL, B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 6, p. 369-382, 2019.

DENNY, C. et al. Guava pomace: a new source of anti-inflammatory and analgesic bioactives. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 235, 2013.

DESNOUES, E. et al. Profiling sugar metabolism during fruit development in a peach progeny with different fructose-to-glucose ratios. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 336, 2014.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; SAINIS, K. B. Immune system and antioxidants, especially those derived from Indian medicinal plants. **Indian J EXp. Biol**, v. 40, n. 6, p. 639-55, 2002.

DIAZ, G., et al. Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates. **Eur. J. Histochem**, v. 51, p. 213–218, 2007.

DJERIDANE, A. et al. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food chemistry**, v. 97, n. 4, p. 654-660, 2006.

DMITRIEVA, O. S. et al. Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. **Biochemistry**, v. 81, n. 2, p. 80-90, 2016.

DO PRADO, S. B. R. et al. Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16564, 2017.

DRAYE, M.; VAN CUTSEM, P. Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. **Journal of plant physiology**, v. 165, n. 11, p. 1152-1160, 2008.

DURÁN-LARA, E. F. et al. Experimental and theoretical binding affinity between polyvinylpolypyrrolidone and selected phenolic compounds from food matrices. **Food chemistry**, v. 168, p. 464-470, 2015.

EFRAIM, P. et al. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacaueiro de diferentes genótipos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229-236, 2006.

EL AIDY, S. DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 146, 2014.

ELIA, M.; CUMMINGS, J. Physiological aspects of energy metabolism and gastrointestinal effects of carbohydrates. **Eur J Clin Nutr**, v. 61, p. S40–S74, 2007.

FABI, J. P. et al. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6118-6123, 2007.

FAJARDO, A. R. et al. Polyelectrolyte complexes based on pectin–NH 2 and chondroitin sulfate. **Carbohydrate polymers**, v. 87, n. 3, p. 1950-1955, 2012.

FIC, E. et al. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 31, n. 21, p. 3573-3579, 2010.

FLINT, H. J. et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. **Gut microbes**, v. 3, n. 4, p. 289-306, 2012.

FLORES, G. et al. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (Psidium guajava) fruits. **Food chemistry**, v. 170, p. 327-335, 2015.

FLORES, G., et al. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (Psidium friedrichsthalianum) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chem**, v.141, n. 2, p. 889-95, 2013.

FLORES-MALTOS, D. A. et al. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 259-267, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Carbohydrates in human nutrition. **Food and Nutrition Paper n. 66**. 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), **GRAS**. Notification for fructooligosaccharides. 2016. Disponível em: <https://www.fda.gov>.

FOOD INGREDIENTES BRASIL (FIB) 2014. **Pectinas**: Propriedades e aplicações. Disponível em: <http://revista-

fi.com.br/upload_arquivos/201606/20160600263320014648976 53.pdf>.

FULLER, S. et al. New horizons for the study of dietary fiber and health: a review. **Plant foods for human nutrition**, v. 71, n. 1, p. 1-12, 2016.

GAO, F. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell death & disease**, v. 7, n. 1, p. e2062, 2016.

GAVA, A. J.; DA SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**: princípios e aplicações NBL Editora, 2009.

GHILDYAL, P. et al. Chemical composition and immunological activities of polysaccharides isolated from the Malian medicinal plant Syzygium guineense. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 2, n. 6, p. 76-85, 2010.

GIL, O. M. et al. Modified drug release system based on Sulindac and layered double hydroxide: An in vivo Raman investigation. **Vibrational Spectroscopy**, v. 87, p. 60-66, 2016.

GLINSKY, V. V.; RAZ, A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 14, p. 1788-1791, 2009.

GÖGEBAKAN, Ö. et al. GIP increases adipose tissue expression and blood levels of MCP-1 in humans and links high energy diets to inflammation: a randomised trial. **Diabetologia**, v. 58, n. 8, p. 1759-1768, 2015.

GOMEZ, M. L. P. A.; LAJOLO, F.; CORDENUNSI, B. Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. **Journal of food science**, v. 67, n. 1, p. 442-447, 2002.

GOMEZ, M. L. P. A.; LAJOLO, F.; CORDENUNSI, B. Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. **Journal of food science**, v. 67, n. 1, p. 442-447, 2002.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927-930, 2002.

GOULAO, L. F.; OLIVEIRA, C. M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 1, p. 4-25, 2008.

GUAN, D. et al. Immunomodulatory activity of polysaccharide from the roots of Actinidia kolomikta on macrophages. **International Journal of Biology**, v. 3, n. 2, p. 3, 2011.

GUESS, B. W. et al. Modified citrus pectin (MCP) increases the prostate-specific antigen doubling time in men with prostate cancer: a phase II pilot study. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 6, n. 4, p. 301, 2003.

GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular signalling**, v. 13, n. 2, p. 85-94, 2001.

HACHIMURA, S.; TOTSUKA, M.; HOSONO, A. Immunomodulation by food: impact on gut immunity and immune cell function. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 584-599, 2018.

HARM, S.; GABOR, F.; HARTMANN, J. Low-dose polymyxin: an option for therapy of Gram-negative sepsis. **Innate immunity**, v. 22, n. 4, p. 274-283, 2016.

HO, G. T. T. et al. Structure–activity relationship of immunomodulating pectins from elderberries. **Carbohydrate polymers**, v. 125, p. 314-322. 2015.

HOLDERNESS, J. et al. Polysaccharides isolated from Acai fruit induce innate immune responses. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17301, 2011.

HONG, E. G. et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2525-2535, 2009.

HOOPER, Lora V.; LITTMAN, Dan R.; MACPHERSON, Andrew J. Interactions between the microbiota and the immune system. **science**, v. 336, n. 6086, p. 1268-1273, 2012.

HOTALING, Nathan A. et al. Biomaterial strategies for immunomodulation. **Annual review of biomedical engineering**, v. 17, p. 317-349, 2015.

HSU, S. et al. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. **J Pharmacol Exp Ther**., v. 306, p. 29–34, 2003.

INSTITUTO DE MEDICINA. **Dietary Reference Intakes** (DRIs). 2016. Disponível em: <http//www.nationalacademies.org/hmd/Activities/Nutrition/SummaryDRI-Tables.aspx>.

ISHIDA, Y. K. et al. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 2, p. 711-721, 2012.

ISHIKAWA, K. et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 661-664, 2008.

JACKSON, C. L. et al. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 805-819, 2007.

JAIN, N. et al. Compositional and enzymatic changes in guava (Psidium guajava L.) fruits during ripening. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 23, n. 3, p. 357-362, 2001.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A. et al. Guava fruit (Psidium guajava L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.

JONES, J. M. Dietary fiber future directions: integrating new definitions and findings to inform nutrition research and communication. **Adv Nutr**., v. 4, n.1, p. 8–15, 2013.

KANG, H. K.; SEO, C. H.; PARK, Y. The effects of marine carbohydrates and glycosylated compounds on human health. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 6018-6056, 2015.

KARPUS, W. J. et al. Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1–related cytokines. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 5, p. 733-741, 1998.

KERMANI, Z. J. et al. Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 424-434, 2015.

KIM, M. H et al. Ursolic acid isolated from guava leaves inhibits inflammatory mediators and reactive oxygen species in LPS-stimulated macrophages. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 37, n. 3, p. 228-235, 2015.

KIRK, E. A. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue. **Diabetes**, v. 57, n. 5, p. 1254-1261, 2008.

KITAGUCHI, K.; YABE, T. Dietary Fiber Pectin is Recognized in a Structure-Specific Manner by Intestinal Cells. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 31, n. 182, p. E91-E97, 2019.

KNUDSEN, K. E. et al. Carbohydrates in pig nutrition–Recent advances. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. supplement3, p. 1-11, 2016.

KOLEY, D.; BARD, A. J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 39, p. 16783-16787, 2010.

KORCZAK, R.; SLAVIN, J. L. Fructooligosaccharides and appetite. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 21, n. 5, p. 377-380, 2018.

KOUAKOU, K. et al. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from Clerodendrum splendens: Beneficial effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 149, 2013.

KRUEGER, M. J.; MAJDE, J. A. Humoral links between sleep and the immune system: research issues. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 992, p. 9–20, 2003

KUMAR, V. et al. Dietary roles of non-starch polysachharides in human nutrition: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 10, p. 899-935, 2012.

KURITA, O.; FUJIWARA, T.; YAMAZAKI, E. Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. **Carbohydrate polymers**, v. 74, n. 3, p. 725-730, 2008.

LAILY, N. et al. The potency of guava Psidium guajava (L.) leaves as a Functional immunostimulatory ingredient. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 301-307, 2015.

LATTIMER, J. M.; HAUB, M. D. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1266-1289, 2010.

LECLERE, L. et al. Identification of a cytotoxic molecule in heat-modified citrus pectin. **Carbohydrate polymers**, v. 137, p. 39-51, 2016.

LECLERE, L.; VAN CUTSEM, P.; MICHIELS, Carine. Anti-cancer activities of pH-or heat-modified pectin. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, 2013.

LEE, S. et al. Metabolic analysis of guava (Psidium guajava L.) fruits at different ripening stages using different data-processing approaches. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 29, p. 2983-2988, 2010.

LEI, W. et al. Immuno-stimulatory activity of a polysaccharide-enriched fraction of Sutherlandia frutescens occurs by the toll-like receptor-4 signaling pathway. **Journal of ethnopharmacology**, v. 172, p. 247-253, 2015.

LEMAIRE, S. et al. Study of macrophage functions in murine J774 cells and human activated THP-1 cells exposed to oritavancin, a lipoglycopeptide with high cellular accumulation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2059-2066, 2014.

LENAZ, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. **IUBMB life**, v. 52, n. 3-5, p. 159-164, 2001.

LEUNG, M. Y. K. et al. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology letters**, v. 105, n. 2, p. 101-114, 2006.

LICHTMAN, A. H, ABBAS, A. K. **Imunologia Básica**: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico. 2 ed. São Paulo: Elsevier/Medicina Nacionais, 2007.

LIMA, A. et al. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 3, 2011.

LIONETTI, V.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D. Methyl esterification of pectin plays a role during plant–pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 16, p. 1623-1630, 2012

LIU, H. Y. et al. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 48, p. 7386, 2008.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. Springer, 2012.

LIVESEY, G. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. **Nutrition Research Reviews**, v. 16, n. 2, p. 163-191, 2003

LÖFGREN, C.; WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A. M. Microstructure and rheological behavior of pure and mixed pectin gels. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 6, p. 1144-1153, 2002.

LONGSTAFF, M. A.; KNOX, A.; MCNAB, J. M. Digestibility of pentose sugars and uronic acids and their effect on chick weight gain and caecal size. **British Poultry Science**, v. 29, n. 2, p. 379-393, 1988.

LONZA, 2015. **Lisado de amebócitos de límulo (LAL) Kinetic-QCL™**. Disponível em: <https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/download/product/asset/28344 >.

LOWRY, C. A. et al. Identification of an immune-responsive mesolimbocortical serotonergic system: potential role in regulation of emotional behavior. **Neuroscience**, v. 146, n. 2, p. 756-772, 2007.

LUND, M. E. et al. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. **Journal of immunological methods**, v. 430, p. 64-70, 2016.

MAGALHÃES, M. L. Modelagem e simulação da síntese enzimática de oligossacarídeos catalisada por dextrana-sacarase usando sacarose como substrato e maltose como aceptor. 2019. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará.

MAGUIRE, K. M., et al. Harvest date, cultivar, orchard and tree effects on water vapor permanence in apples. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.125, n.1, p.100-104, 2000.

MAMAT, U. et al. Endotoxin-free protein production—ClearColi™ technology. **Nature Methods**, v. 10, n. 9, p. 916, 2013.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Lett**, v. 235, p. 114-120, 2006.

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, n. 1, p. 99-107, 2002.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **European journal of immunology**, v. 37, n. 1, p. 14-16, 2007

MAXWELL, E. G. et al. Pectin–an emerging new bioactive food polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n. 2, p. 64-73, 2012.

MEISSNER, H.; LIEBL, W. Thermotoga maritima maltosyltransferase, a novel type of maltodextrin glycosyltransferase acting on starch and malto-oligosaccharides. **European journal of biochemistry**, v. 258, n. 3, p. 1050-1058, 1998.

MENDONÇA, R. D. et al. Caracteristicas físicas e químicas de goiabas' Cortibel 1'e'Cortibel 4'armazenadas em condições ambientais. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 685-692, 2007.

MERLY, L.; SMITH, S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something?. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 39, n. 2, p. 55-58, 2017.

MITTAL, P. et al. Inhibiting the CCR2/MCP-1 chemokine pathway blocks MDSC recruitment and promotes anti-tumor immunity. **Cancer research**, 2019.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in plant science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

MONTI, P. et al. The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. **Cancer research**, v. 63, n. 21, p. 7451-7461, 2003.

MORGAN, D. M. L. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. **Polyamine protocols**, p. 179-184, 1998.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of leukocyte biology**, v. 73, n. 2, p. 209-212, 2003.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 24, p. 1854-1862, 2002.

NELSON, D. L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

NETEA, M. G.; QUINTIN, J. VAN DER MEER, J. W. M. Trained immunity: a memory for innate host defense. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 5, p. 355-361, 2011.

NGUYEN, D. N. et al. Transforming growth factor-β2 and endotoxin interact to regulate homeostasis via interleukin-8 levels in the immature intestine. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 7, p. G689-G699, 2014.

OLIVEIRA, F. C. Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para a obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado. 2015. 199 f. Tese (Doutorado em ciências)- Escola de engenharia de Lorena- Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico**, 2007.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E.; VÁZQUEZ-RIASCOS, A. Effect of processing and storage time on the vitamin C and lycopene contents of nectar of pink guava (Psidium guajava L.). **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 60, n. 3, p. 280, 2010.

PALM, N. W.; DE ZOETE, M. l R.; FLAVELL, R. A. Immune–microbiota interactions in health and disease. **Clinical immunology**, v. 159, n. 2, p. 122-127, 2015.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Quimiocinas e imunidade. **Einstein**, v. 13, n. 3, 2015.

PAULSEN, B. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Current organic chemistry**, v. 5, n. 9, p. 939-950, 2001.

PEREDA, J. A. O. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Ed. Artmed. 2005.

PERES, C. M.; CURI, R. Como cultivar células. In: **Como cultivar células**. Guanabara Koogan, 2005.

PERONI-OKITA, F. H. G et al. In vivo degradation of banana starch: Structural characterization of the degradation process. **Carbohydrate polymers**, v. 81, n. 2, p. 291-299, 2010.

PEROTTI, V. E.; MORENO, A. S.; PODESTÁ, F. O. E. Physiological aspects of fruit ripening: the mitochondrial connection. **Mitochondrion**, v. 17, p. 1-6, 2014.

PLATA-SALAMAN, C. R.; BORKOSKI, J. P. Chemokines/intercrines and central regulation of feeding. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 5, p. R1711-R1715, 1994.

PLATT, D. Inventor; **Modified pectin**. United States patent US 7491708 B1. 2009 Feb 17.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 435–441, 2009.

RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 5, p. 563-569, 2000.

RASHIDA, E.; EL FADIL, E. B.; EL TINAY, A. H. Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 395-399, 1997.

REILLY, T. P. et al. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 803-810, 1998.

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

ROBYT, J. F. **Essentials of Carbohydrate Chemistry**. Springer, New York. Saenger, W., 1980. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, 344–362. 1998

ROMANATTO, T. et al. TNF-α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient—effects on leptin and insulin signaling pathways. **Peptides**, v. 28, n. 5, p. 1050-1058, 2007.

ROMANI, N., et al. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. APMIS. v. 111, p. 725-40, 2003.

ROSTENE, W.; KITABGI, P.; PARSADANIANTZ, S. M. Chemokines: a new class of neuromodulator?. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 895, 2007.

ROTHWELL, N. J; LUHESHI, G. N.Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends in Neuroscience**, v. 23, p. 618–625, 2000.

ROUMEAS, L., A. C., D. E.; FULCRAND, H. Depolymerisation of condensed tannins in ethanol as a gateway to biosourced phenolic synthons. **Green Chemistry**. v. 15, n. 11, p. 3268-3275, 2013.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**., v. 9, n. 5, p. 313–323, 2009.

SALAJEGHEH, A. Interleukins. In: Angiogenesis in Health, Disease and Malignancy. **Springer, Cham**, p. 181-188, 2016.

SALIBA, E. de O. S. et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SANSONE, M. Avaliação do perfil imunomodulador de frações polissacarídicas não-amido isoladas de banana. 2017. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade de São Paulo.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int Immunopharmacol**, v. 6, p. 317-333, 2006.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. **Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal**. Disponível em: < https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/19149/2/1.pdf >. 2013

SCHULENBURG, H.; KURZ, C. L, EWBANK, J. J. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. **Immunol Rev**. v. 198, p. 36-58. 2004

SCOTT, K. P., S. W. et al. The inuence of diet on the gut microbiota. **Pharmacol**. Res. v. 69, p. 52–60. 2013.

SELANI M. M. et al. Physicochemical, functional and antioxidant properties of tropical fruits co-products. **Plant Foods Hum Nutr**., v. 71, n. 2, p. 137–144, 2016.

SETIAWAN, B. et al. Carotenoid content of selected Indonesian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 2, p. 169-176, 2001.

SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. Biochemistry of fruit ripening. **Springer Science & Business Media**, 2012.

SHIGA, T. M. et al. Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. **J Sci Food Agric**. v. 91, p. 1511-6, 2011.

SHIRATORI, H. et al. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. **Molecular immunology**, v. 88, p. 58-68, 2017.

SAHOO, M. et al. Role of the inflammasome, IL-1β, and IL-18 in bacterial infections. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 2037-2050, 2011.

SHUKLA, S.; BAJPAI, V. K.; KIM, M. Plants as potential sources of natural immunomodulators. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 13, n. 1, p. 17-33, 2014.

SIDDESHWAR, S. et al. Screening and Estimation of Pre-biotic Oligosaccharides in Fruits and Vegetables. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 183-191, 2008.

SIGMA ALDRICH (SIGMA). **Polymyxin B** – agarose. 1997. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p1411pis.pdf >.

SILA, D. N. et al. Pectins in processed fruits and vegetables: Part II—Structure–function relationships. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 86-104, 2009.

SILIN, D. S. et al. Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 11, p. 1238-1247, 2009.

SILVA, M. O. Atividade antioxidante e composição de oligossacarídeos em subproduto obtido do processamento industrial da goiaba (Psidium guajava). 2015. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Univerdidade estadual de Campinas.

SILVA, S. S. et al. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. Polímeros: **Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 25-33, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds.** New York: John Wiley & Sons. 464p, 2005.

SINGH, S. P. et al. Prebiotic oligosaccharides: Special focus on fructooligosaccharides, its biosynthesis and bioactivity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 183, n. 2, p. 613-635, 2017.

SIQUEIRA, A. M. A. et al. Pigments of guava paluma cultivar stored under environmental conditions. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 6, p. 320-323, 2011.

SMYTH, M. J.; TANIGUCHI, M.; STREET, S. E A. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 5, p. 2665-2670, 2000.

SOARES, F. D. et al. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (Psidium guajava) at different stages of maturity. **Food Chemistry**. v. 100, n.1, p. 15-21, 2007.

SOENEN, S. J. DE CUYPER, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast Media Mol**. **Imaging**, v. 4, p. 207–219, 2009.

SOUZA, R. M. **Goiaba produzida em espaldeira rende mais**. 2008. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,goiaba-produzida-em-espaldeira-rendemais,243207.

SPILLER, G.A. **Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition**. 3 a. Edição. CRC Press. 2001.

SPILLER, S. H. et al. Modificações nos métodos de extração de pectina em goiabas cv.“Pedro Sato” durante amadurecimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A Review. **Silpakorn University International Journal**, v.3, p.206-228, 2003.

SRIVASTAVA, A.; HANDA, A. K. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 24, p. 67–82, 2005.

STEKOL'NIKOV, A. A. et al. Wound healing activity of immunomodulatory of natural and synthetic origin. **Veterinary science**, 2018.

STOCKERT, J. C., et al. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochem**, v. 114, p. 785–796, 2012.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability Current protocols in immunology. **Curr Protoc. Imunol**. 2001.

SURVESWARAN, S. et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v.102, p. 938-953, 2007.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of Prunus domestica. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TABARSA, M. et al. Water-soluble polysaccharides from Ulva intestinalis: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 2, p. 599-608, 2018.

TACIAK, B. et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198943, 2018.

TAKEHASHI, S. et al. An antitumor necrosis factor antibody suppresses sleep in rats and rabbits. **Brain Research**, v. 690, p. 241–244, 1995.

TAMIR, M.; NACHTOMI, E.; ALUMOT, E. Degradation of tannins from carob pods (Ceratonia siliqua) by thioglycolic acid. **Phytochemistry**, v. 10, n. 11, p. 2769-2774, 1971.

TAN, H. Y. et al. The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

TANTIPAIBOONWONG, P. et al. Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients. **Proteomics**. v. *5*, n. 4, p. 1140-1149, 2005.

TARRAHI, S.; HAJNAJARI, H.; BADII, F. Comparison of Pectin Biosynthesis in Local Apple Cultivar'Azayesh'and Some Commercial Cultivars as Affected by pH and Carbohydrates Content. In: **VI International Postharvest Symposium 877**. p. 1137-1144. 2009

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin – a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **Boca Raton**, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

TREWYN, B. G. et al. Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane penetration. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, n. 1, p. 23-29, 2008.

TRIANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends in immunology**, v. 23, n. 6, p. 301-304, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133, 2003.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quím. Nova**. v.30, n. 2. 2007.

VENZON, S. S., et al. Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 7, p. 4102-4112, 2015.

VERRIJSSEN, T. A. J et al. The effect of pectin concentration and degree of methyl-esterification on the in vitro bioaccessibility of β-carotene-enriched emulsions. **Food Research International**, v. 57, p. 71-78, 2014.

VIEIRA, A. S. Secagem de resíduo de goiaba em secador convectivo de bandejas: modelagem matemática e análise do processo. 2014. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2014.

VINOLO, M. A. R et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 858-876, 2011.

VISTICA, D. T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer research**, v. 51, n. 10, p. 2515-2520, 1991.

VOIGT, J.; BIEHL, B.; KAMARUDDIN, S. The major seed proteins of Theobroma cacao L. **Food Chem**. v. 47, p. 145-151, 1993.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**. p.20:263, 2009.

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

WAKABAYASHI, K.; HOSON, T.; HUBER, D. J. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (Persea americana) and tomato (Lycopersicon esculentum) polygalacturonases. **Journal of plant physiology**, v. 160, n. 6, p. 667-673, 2003.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 614, 2014.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010.

WASCHECK, R. C. Pectina um carboidrato complexo e suas aplicações. **Estudos, Goiânia**, v. 35, n. 3, p. 343-355, 2008.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl Microbiol Biot**. 2002; 10:13-32.

WEICKERT, M. O.; PFEIFFER, A. F. H. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 3, p. 439-442, 2008.

WICHERS, H. Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease?. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 1, p. 37-45, 2009.

WILLATS, W. G. et al. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Cell Walls**. p. 9-27, 2001.

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

WOLF, S.; MOUILLE, G.; PELLOUX, J. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. **Molecular plant**, v. 2, n. 5, p. 851-860, 2009.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Review in polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, n. 33, p. 423-447, 2000.

WONG, J. M. W et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 235-243, 2006.

WONG, J. M. W. et al. **Dietary Fiber, Soluble and Insoluble**, Carbohydrates, Fructose, and Lipids. In: The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. Academic Press, p. 187-200, 2017.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A., QUINN, M. T. Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from T anacetum vulgare L. **International Immunopharmacology**. v. 7, p.1639–1650, 2007.

YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T. Influência da embalagem de atmosfera modificada e do tratamento com cálcio na cinética de degradação de ácido ascórbico e perda de massa em goiabas (Psidium guajava L.). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 20, n. 1, p. 27-31, 2000.

YAPO, B. M. KOFII, K. L. Extraction and characterization of gelling and emulsifying pectin fractions from cacao po husk. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 4, p. 46-51, 2013.

YIN, J. Y., et al. Molecular properties and immunomodulatory activities of a water-soluble heteropolysaccharide isolated from Plantago asiatica L. leaves. **Natural product research**, v. 33, n. 11, p. 1678-1681, 2019.

YOO, S. H. et al. Monovalent salt-induced gelling system of enzymatically deesterified pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 7410–7417, 2003.

YOO, S. H. et al. Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. **Food hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 62-67, 2006.

YU, C. et al. Platelet derived CCL5 regulates CXC chemokine formation and neutrophil recruitment in acute experimental colitis. **Journal of cellular physiology**, v. 231, n. 2, p. 370-376, 2016.

YULIARTI, O. et al. Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods. **Food chemistry**, v. 166, p. 479-485, 2015.

ZHANG, L. et al. Alive and dead Lactobacillus rhamnosus GG decrease tumor necrosis factor-α–induced interleukin-8 production in caco-2 cells. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 7, p. 1752-1756, 2005.

ZHANG, R. et al. Combination of MIG (CXCL9) chemokine gene therapy with low-dose cisplatin improves therapeutic efficacy against murine carcinoma. **Gene therapy**, v. 13, n. 17, p. 1263, 2006.

ZHANG, X.; MOSSER, D. Macrophage activation by endogenous danger signals. **J. Pathol**. v. 214, p.161-178, 2008.

ZHAO, Z. Y et al. The role of modified citrus pectin as an effective chelator of lead in children hospitalized with toxic lead levels. **Alternative Therapies**. v. 14, n. 4, p. 34-38, 2008.

ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M. R. The activation antigen CD69. **Stem cells**, v. 12, n. 5, p. 456-465, 1994.

ZIJLSTRA, R. T. et al. Starch and fiber properties affect their kinetics of digestion and thereby digestive physiology in pigs. **Journal of animal science**, v. 90, n. Supplement_4, p. 49-58, 2012.