

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**IGLESIAS DE LACERDA BEZERRA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO DO POTENCIAL ANTI-  
INFLAMATÓRIO DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DOS VINHOS CABERNET  
FRANC, CABERNET SAUVIGNON E SAUVIGNON BLANC**

**CURITIBA**

**2016**

IGLESIAS DE LACERDA BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO DO POTENCIAL ANTI-  
INFLAMATÓRIO DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DOS VINHOS CABERNET  
FRANC, CABERNET SAUVIGNON E SAUVIGNON BLANC**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), Curso de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Bezerra, Iglesias de Lacerda

Caracterização estrutural e estudo do potencial anti-inflamatório de polissacarídeos extraídos dos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc. / Iglesias de Lacerda Bezerra. – Curitiba, 2016.  
108 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Guilherme Lanzi Sassaki

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

1. Vinho e vinificação - Microbiologia 2. Inflamação 3. Polissacarídeos  
I. Título II. Sassaki, Guilherme Lanzi III. Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

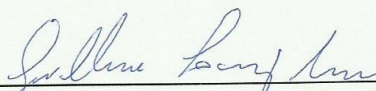
CDD (20. ed.) 574.192482

## TERMO DE APROVAÇÃO

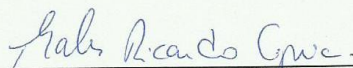
IGLESIAS DE LACERDA BEZERRA

Caracterização estrutural e estudo do potencial anti-inflamatório de polissacarídeos extraídos dos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki - Orientador  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Yanna Dantas Rattmann  
Departamento de Saúde Comunitária, UFPR

Curitiba, 25 de fevereiro de 2016.

Dedico esse trabalho à minha querida mãe, Socorro, pelo amor, proteção, força e toda dedicação para que eu seja uma pessoa melhor a cada dia. Tudo que faço é pensando em você. Sem seu apoio eu não teria conseguido.

E ao meu companheiro, Marcelo, pelo amor, por me incentivar a correr atrás dos meus sonhos, por se fazer presente em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me guiar e me dar força para seguir, minha vida não faria sentido se o Senhor não estivesse presente.

A minha mãezinha, Socorro, por ter me criado com tanto amor e dedicação, por ter todas as respostas para minhas incertezas no seu simples olhar, por toda sua vida ter tido minha educação como prioridade. Minha guerreira, meu exemplo de vida.

Aos meus paidrinhos, Francisco e Francinaldo, e ao meu paidrasto, José, pelo apoio, pelos conselhos e incentivo, por terem batalhado tanto pelo meu sucesso. Vocês são verdadeiros presentes de Deus.

Aos meus anjinhos, Sara e Lucas, meus irmãos e a minha enteada/filha Heloisa que dão brilho e alegria para minha vida, os donos dos melhores abraços.

Ao meu amigo, companheiro e namorado, Marcelo, por ser tão dedicado a mim, por me socorrer e me proteger em todas as situações, por me ajudar sempre que preciso. Obrigada pelo companheirismo, pelo amor, por não deixar que eu desista dos meus sonhos e acreditar que eu sou capaz de conseguir tudo que desejo.

A todos da minha família, pelo apoio e por me terem sempre com tanto carinho.

A família Ramos, pelo carinho, apoio e amizade.

Ao meu orientador, professor Dr. Guilherme, pelos ensinamentos, pela orientação, pela oportunidade de realizar esse trabalho e por ter me desafiado a crescer e por acreditar em mim, por ser meu exemplo dentro do mundo acadêmico.

Aos professores Dr. Thales e Dra. Yanna por terem aceitado fazer parte da minha banca avaliadora e por serem sempre prestativos.

A Rosane, Ana e Elis pelas análises de GC-MS, RMN e HPSEC-MALLS.

Ao Arquimedes e Elaine pela colaboração com as análises e com o cultivo celular e por todo apoio dado durante a execução do meu trabalho e pela amizade.

A Adriana e Aninha, pela ajuda com meus experimentos, pela amizade, carinho, paciência, risadas e aventuras.

A todas as meninas da célula, pelas palavras, pelos conselhos religiosos, pela amizade e por tornarem minhas semanas mais alegres.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pelas disciplinas ministradas, pela contribuição para a minha formação.

A todos os pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pela colaboração e amizade.

A todos os amigos do laboratório, por toda ajuda que me deram, pela amizade e convivência agradável.

A coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pela dedicação prestada ao crescimento do curso.

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma na minha formação e na realização desse trabalho, e que torceram pelo meu sucesso, muito obrigada!

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luiz Fernando Veríssimo

## RESUMO

Existem poucos trabalhos sobre caracterização de polissacarídeos de vinhos. A estrutura e as quantidades de polissacarídeos liberados dependem do processo de vinificação e podem influenciar as propriedades sensoriais, a qualidade dos vinhos e possivelmente os benefícios para a saúde. No entanto, não foram encontrados na literatura científica, estudos que mostrem alguma relação entre os polissacarídeos encontrados nos vinhos e atividades biológicas, como a anti-inflamatória. Com isso, esse trabalho teve como objetivo a caracterização estrutural dos polissacarídeos encontrados em três tipos de vinhos: Cabernet Franc (ACF), Cabernet Sauvignon (ACS) e Sauvignon Blanc (ASB) e avaliação da capacidade das amostras estudadas de inibirem mediadores inflamatórios *in vitro*. Os vinhos foram concentrados e os polissacarídeos foram obtidos por meio de precipitação etanólica seguida de centrifugação, diálise, liofilização, congelamento e degelo, precipitação de Fehling e fracionamento por coluna de troca iônica. Os polissacarídeos foram caracterizados estruturalmente por métodos químicos, por ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de ionização eletrônica (GC-MS), análise de metilação e cromatografia líquida de exclusão estérica acoplada à índice de refração de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS). Os rendimentos dos polissacarídeos dos vinhos foram: 0,16% (ACF), 0,05% (ACS) e 0,02% (ASB). A composição monossacarídica mostrou a presença de Gal, Ara, Rha, GalA, Glc, 2-O-metil-Xyl, 2-O-metil-Fuc e Man em diferentes concentrações. Todas as frações apresentaram teor de <1% de proteínas. As frações apresentaram um perfil de eluição heterogênea em HPSEC-MALLS, sugerindo uma mistura de polissacarídeos. Através da RMN heteronuclear de 2D-HSQC e a análise de metilação foi possível identificar a presença de arabinogalactanas do tipo II, ramnogalacturananas do tipo I e II, mananas e dextrinas. O potencial anti-inflamatório dos polissacarídeos foi avaliado através da inibição de NF- $\kappa$ B em células RAW-Blue. Todas as frações estudadas apresentaram propriedade anti-inflamatória quando testadas *in vitro* na dose 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os resultados das análises químicas, espectrométricas e espectroscópicas forneceram

um “*fingerprint*” molecular para os polissacarídeos de cada tipo vinho, uma vez que os polissacarídeos dos vinhos apresentaram rendimentos e quantidades diferentes, podendo auxiliar na determinação de uma assinatura dos vinhos analisados.

Palavras-chave: vinhos, polissacarídeos, inflamação.

## ABSTRACT

There are few works about characterization of polysaccharides of wines. The structure and amounts of polysaccharides released depend on the wine-making process and can influence the sensory properties, quality of the wines and benefits for health. However, there were not found in scientific literature, studies showing a relationship between the polysaccharides found in wines and biological activities. This work aimed structural characterization of the polysaccharides found in three types of wines: Cabernet Franc (ACF), Cabernet Sauvignon (ACS) and Sauvignon Blanc (ASB). The wines were concentrated and the polysaccharides were obtained via ethanolic precipitation followed centrifugation, dialysis, freeze dry, freezing-thawing, fehling precipitation and fractionation with ion exchange column. The polysaccharides have been characterized structurally by chemical methods, nuclear magnetic resonance (NMR) 1D and 2D  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, gas chromatography-mass spectrometry electron ionization (GC-MS), methylation analysis and liquid chromatography coupled steric exclusion the laser light scattering refractive index in multi angles (HPSEC-MALLS). The anti-inflammatory potential of the polysaccharides through inhibition of NF- $\kappa$ B in Raw-Blue cells. Polysaccharide yields were: 0,16% (ACF), 0,05% (ACS) and 0,02% (ASB). The fractions showed monosaccharide composition containing Ara, Rha, GalA, Glc, Gal, Man, Xyl e Fuc in different concentrations. All fractions have <1% content of protein. All the samples showed a heterogeneous elution profile, suggesting the presence of polysaccharide mixture. By heteronuclear NMR 2D-HSQC and methylation analysis was possible to identify the presence of type II arabinogalactan, type I and II rhamnogalacturans, mannans, and dextrans. The anti-inflammatory potential of the polysaccharides was evaluated through the inhibition of NF- $\kappa$ B in RAW-blue cells. All samples showed anti-inflammatory property when tested in vitro in a dose 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The results of chemical, spectrometric and spectroscopic analyzes can furnish a fingerprint for each wine, since the profile of the mixtures had different yields and quantities, aiding for a non-volatile based singular signature.

Keywords: wines, polysaccharides, inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	-	Estrutura da baga da uva.....	23
FIGURA 2	-	Fluxograma da produção do vinho tinto.....	28
FIGURA 3	-	Uva Cabernet Franc.....	31
FIGURA 4	-	Uva Sauvignon Blanc.....	32
FIGURA 5	-	Uva Cabernet Sauvignon.....	33
FIGURA 6	-	Modelo da estrutura da parede celular primária de vegetal....	37
FIGURA 7	a)	Ativação dos macrófagos através das vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1. b) Recrutamento de leucócitos e processo inflamatório.....	47
FIGURA 8	-	Fluxograma do processo de extração e fracionamento dos polissacarídeos obtidos a partir dos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc.....	58
FIGURA 9	-	Perfis de eluição em HPSEC-MALLS, utilizando detector de índice de refração (RID), das frações ACF, ACS e ASB obtidas pelo processo de fracionamento dos polissacarídeos extraídos com etanol.....	60
FIGURA 10	-	Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ das frações ACF, ACS e ASB com deslocamentos químicos expressos em ppm ( $\delta$ ).....	62
FIGURA 11	-	TLC das frações ACF, ACS e ASB.....	63
FIGURA 12	-	Perfis de eluição em HPSEC-MALLS, utilizando detector de índice de refração (RID), das frações FCF-0M, FCF-0,1M, FCF-0,2M, FCF-0,3M e FCF-01M obtidas pelo processo de fracionamento coluna com resina DEAE-Sepharose <i>Fast Flow</i> .....	67
FIGURA 13	-	Espectros de HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ) das frações F-0M, F-0,1M, F-0,2M, F-0,3M e F-0,5M em $\text{D}_2\text{O}$ , a 30 °C, com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm. A ( $\alpha$ -L-Araf); B ( $\beta$ -Galp); C ( $\alpha$ -L-Rhap); D ( $\alpha$ -D-GalpA); E ( $\alpha$ -D-	

	<i>Manp</i> ); TNR (terminal não redutor).....	70
FIGURA 14	- Perfil de eluição em HPSEC-MALLS, utilizando detector de índice de refração (RID), da fração PSB.....	71
FIGURA 15	- Espectro de HSQC (RMN- <sup>13</sup> C/ <sup>1</sup> H) de PSB (em D <sub>2</sub> O), a 30 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.	71
FIGURA 16	- Estrutura sugerida para a manana presente na fração PSB..	73
FIGURA 17	- Espectro de HSQC (RMN- <sup>13</sup> C/ <sup>1</sup> H) das frações ACF, ACS e ASB (em D <sub>2</sub> O), a 30 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. A (α-L-Araf); B (β-D-Galp); C (α-L-Rhap); D (α-D-GalpA); E (α-D-Manp); F (α-D-Glc); TNR (terminal não redutor).....	77
FIGURA 18	- Estrutura sugerida para a arabinogalactana do tipo II.....	79
FIGURA 19	- Estrutura sugerida para a ramnogalacturonana do tipo I.....	80
FIGURA 20	- GC-MS contendo tempo de retenção e fragmentação das unidades de 2-O-metil-xilose e 2-O-metil-fucose.....	82
FIGURA 21	- Efeito das frações ACF, ACS e ASB após tratamento por 24 e 48h sobre a atividade celular de macrófagos (RAW-Blue)..	86
FIGURA 22	- Efeito das frações ACF, ACS e ASB na inibição de NF-κB em linhagem de célula RAW-Blue.....	87

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Composição monossacarídica das frações ACF, ACS e ASB.....	59
TABELA 2	- Composição monossacarídica das frações obtidas a partir do método de Fehling.....	64
TABELA 3	- Composição monossacarídica do fracionamento obtido a partir da fração FCF.....	65
TABELA 4	- Perfil dos acetatos de alditóis parcialmente metilados obtidos por análise de metilação de PSB.....	72
TABELA 5	- Acetatos de alditóis parcialmente metilados obtidos por análise de metilação de FCF-0,3M.....	80
TABELA 6	- Rendimento dos polissacarídeos nos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc.....	84

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta$	Deslocamento químico
ACF	Cabernet Franc – fração solúvel (congelamento e degelo)
ACS	Cabernet Sauvignon – fração solúvel (congelamento e degelo)
AG	Arabinogalactana
AG I	Arabinogalactana do tipo I
AG II	Arabinogalactana do tipo II
Ara	Arabinose
ASB	Sauvignon Blanc – fração solúvel (congelamento e degelo)
AP-1	Proteína ativadora
BaCO <sub>3</sub>	Carbonato de bário
CF	Cabernet Franc
CS	Cabernet Sauvignon
CH <sub>3</sub> I	Iodo metano
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
dn/dc	Taxa de variação do índice de refração com a concentração
FBS	Soro fetal bovino
FCF	Cabernet Franc – sobrenadante de Fehling
FCS	Cabernet Sauvignon – sobrenadante de Fehling
FSB	Sauvignon Blanc – sobrenadante de Fehling

Fuc	Fucose
GalA	Ácido galacturônico
Gal	Galactose
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Glc	Glucose
GlcA	Ácido glucurônico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HGs	Homogalacturonanas
HPSEC-MALLS	Cromatografia de exclusão estérica de alta performance com detector de espalhamento de luz de multiângulos
ICF	Cabernet Franc – fração insolúvel (congelamento e degelo)
ICS	Cabernet Sauvignon – fração insolúvel (congelamento e degelo)
IL-1, IL-6, IL-12	Interleucinas
IFN- γ	Interferon- γ
ISB	Sauvignon Blanc – fração insolúvel (congelamento e degelo)
KOH	Hidróxido de potássio
LPS	Lipopolissacarídeos
MPs	Manoproteínas
Me <sub>2</sub> SO	Dimetilsulfóxido
NaBD <sub>4</sub>	Boroidreto de sódio deuterado
Man	Manose
MES	ácido 2-(N-morfolina)-etanosulfônico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H- tetrazólio
NaBD <sub>4</sub>	Boroidreto de sódio deuterado

NaBH <sub>4</sub>	Boroidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Célula natural killer
NO	Óxido nítrico
PCF	Cabernet Franc – precipitado de Fehling
PCS	Cabernet Sauvignon – precipitado de Fehling
PSB	Sauvignon Blanc – precipitado de Fehling
ppm	Partes por milhão
RG I	Ramnogalacturonana do tipo I
RG II	Ramnogalacturonana do tipo II
Rha	Ramnose
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SB	Sauvignon Blanc
SEAP	Fosfatase alcalina embrionária secretável
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SO <sub>2</sub>	Gás anidrido sulfuroso
TLC	Cromatografia de camada delgada
TLRs	Receptores toll-like
TFA	Ácido trifluoroacético

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
3.1.	UVA.....	23
3.1.1.	Tipos de videira.....	25
3.2.	VINHO.....	25
3.2.1.	Processo de produção do vinho.....	27
3.2.1.1.	Cabernet Franc.....	30
3.2.1.2.	Sauvignon Blanc.....	31
3.2.1.3.	Cabernet Sauvignon.....	32
3.2.2.	Benefícios do vinho.....	33
3.2.3.	Carboidratos dos vinhos.....	35
3.2.3.1.	Parede celular vegetal e polissacarídeos.....	35
3.2.3.1.1.	Arabinogalactanas.....	38
3.2.3.1.2.	Ramnogalacturonanas.....	39
3.2.3.2.	Parede celular de leveduras e polissacarídeos.....	40
3.2.3.2.1.	Mananas.....	41
3.3.	PROCESSO INFLAMATÓRIO E POLISSACARÍDEOS.....	41
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
4.1.	MATERIAL DE ESTUDO.....	46
4.2.	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	46
4.2.1.	Obtenção de polissacarídeos por precipitação etanólica.....	46
4.3.	PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	46
4.3.1.	Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo.....	46
4.3.2.	Fracionamento dos polissacarídeos pelo método de Fehling.....	47
4.3.3.	Fracionamento dos polissacarídeos por coluna de troca iônica.....	47
4.4.	ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS.....	48

4.4.1. Composição monossacarídica.....	48
4.4.2. Metilação dos polissacarídeos isolados e análise na forma de acetatos alditóis.....	49
4.4.3. Carboxirredução.....	49
4.5. TESTE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR.....	50
4.6. MÉTODOS ANÁLITICOS.....	51
4.6.1. Método cromatográfico.....	51
4.6.1.1. Cromatografia de camada delgada (inglês: <i>Thin layer chromatography</i> , TLC).....	51
4.6.1.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	51
4.6.2. Método Espectroscópico.....	52
4.6.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	52
4.6.3. Métodos Espectrofotométricos.....	52
4.6.3.1. Dosagem de ácidos urônicos.....	52
4.6.3.2. Dosagem de proteínas totais.....	53
4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS POLISSACARÍDEOS <i>IN VITRO</i> .....	53
4.7.1. Cultivo celular.....	53
4.7.2. Determinação da atividade celular (MTT).....	54
4.7.3. Determinação da ativação das vias de NF- $\kappa$ B e AP-1.....	55
4.7.4. Análise estatística.....	56
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>57</b>
5.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	57
5.1.1. Análise estrutural da manana.....	70
5.1.2. Análise estrutural dos polissacarídeos: arabinogalactana e ramnogalacturonana.....	73
5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS POLISSACARÍDEOS <i>IN VITRO</i> .....	84
5.2.1. Efeito das frações ACF, ACS e ASB sobre a atividade celular de macrófagos da linhagem RAW-Blue.....	84
5.2.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória mediado das frações ACF, ACS e ASB.....	86

6.	CONCLUSÕES.....	89
7.	REFERÊNCIAS.....	90

## 1. INTRODUÇÃO

O vinho é, genericamente, uma bebida alcoólica produzida por fermentação do sumo da uva. Ele é legalmente definido como o produto obtido exclusivamente por fermentação parcial ou total de uvas frescas, inteiras ou esmagadas, ou de mostos (sumo de uvas frescas, obtido antes do processo de fermentação) (CRUZ, 2006).

Existem três tipos distintos de vinhos: tinto, branco e rosé. Os vinhos tintos podem ser obtidos através das uvas tintas ou das tintureiras (aquelas em que a polpa também possui pigmentos). Os vinhos brancos podem ser obtidos através de uvas brancas ou de uvas tintas desde que as cascas dessas uvas não entrem em contato com o mosto e que essas não sejam tintureiras. Já os vinhos rosés, podem ser produzidos de duas maneiras: misturando-se o vinho tinto com o branco ou diminuindo o tempo de maceração (contato do mosto com as cascas) durante a vinificação do vinho tinto (CRUZ, 2006).

O vinho é, geralmente, produzido a partir de uvas das variedades (ou castas) da espécie *Vitis vinifera*. Quando uma variedade de uva é utilizada como uva predominante (geralmente definido por lei, no mínimo 75 a 85 por cento), o resultado é um vinho varietal (também dito monocasta). Os vinhos também podem ser produzidos a partir de misturas de duas ou mais variedades de uvas, originando uma combinação de sabores e aromas (CRUZ, 2006; HOFFMAN, 2009).

A constituição química das uvas permite que elas fermentem sem que lhes sejam adicionados açúcares, ácidos, enzimas ou outros nutrientes (JOHNSON, 1989). O termo vinho é definido por lei em muitos países, apenas o fermentado obtido da uva pode ser chamado oficialmente de vinho (ROSEMARY, 1989). A fermentação das uvas é feita por leveduras que consomem os açúcares presentes nas uvas transformando-os em álcool (CRUZ, 2006).

As principais macromoléculas encontradas no vinho são os polifenóis (até 35%) e os polissacarídeos (até 15%) (CARPITA, *et al.*, 1993). A estrutura dos polissacarídeos varia de acordo com o tipo de uva e vinho, visto que depende do processo de vinificação e do tratamento enzimático (DOCO *et al.*, 1999;

AYESTARAN *et al.*, 2004; GUADALUPE *et al.*, 2007). Os polissacarídeos são provenientes de bagas da uva, de leveduras, de bactérias e da contaminação por fungos. Do ponto de vista enológico e quantitativo, os polissacarídeos de uvas e de leveduras são os mais importantes, visto que os polissacarídeos encontrados nos vinhos são em sua maioria provenientes provavelmente de uma dessas duas fontes. Os que são ricos em arabinose e galactose (PRAGs), ramnogalacturonanas de tipo I (RG I) e tipo II (RG II), e homogalacturonanas (HGs) são derivados das bagas das uvas, enquanto que os polissacarídeos do tipo glucanas, mananas e manoproteínas (MPs) são derivados da levedura durante a fermentação etanólica (CRUZ, 2006; HOFFMAN, 2009; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013).

Embora já tenha sido relatada a presença de grande quantidade de polissacarídeos nos vinhos, poucos estudos foram feitos a fim de caracterizá-los. Algumas pesquisas feitas com vinhos, mostram a composição polissacarídica do Merlot (DOCO *et al.*, 1999; DUCASSE *et al.*, 2010), Carignan (DUCASSE *et al.*, 2010), Tempranillo (MORÍN *et al.*, 2014), Monastrell (APOLINAR-VALÍENTE *et al.*, 2014) e Chardonay (BORDIGA *et al.*, 2012).

Os polissacarídeos têm uma influência importante em várias fases do processo de vinificação, incluindo fermentação, filtração e estabilização (GERBAUD *et al.*, 1997; MOINE-LEDOUX, 1999; VERNHET, 1999). Esses polissacarídeos podem estar relacionados com diversos benefícios para a saúde, visto que estudos feitos com polissacarídeos extraídos de plantas, frutas e fungos já mostraram a relação com atividades biológicas, dentre elas, antiviral, antitumoral, imunoestimulante, anti-inflamatória, anticomplemento, anticoagulante, hipoglicemiante e antiúlcera gástrica (SRIVASTAVA e KULSHVESHTHA, 1989; YAMADA, 1994; CAPEK *et al.*, 2003; RENARD *et al.*, 2005, CIPRIANI *et al.*, 2006, 2009; SIMAS-TOSIN *et al.*, 2012; DARTORA *et al.*, 2013). No entanto, não foram encontrados na literatura científica estudos que mostrem alguma relação entre os polissacarídeos encontrados nos vinhos e atividades biológicas.

Portanto, devido a elevada importância econômica mundial do vinho, e pela escassez de estudos relacionados à caracterização dos polissacarídeos, nesse trabalho foi realizada a caracterização estrutural dos polissacarídeos dos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc, a fim de fornecer um

“*fingerprint*” para cada vinho. Além disso, foi avaliada a capacidade desses polissacarídeos de interferirem na regulação de mediadores inflamatórios, uma vez que estudos anteriores já relataram propriedade anti-inflamatória dos polissacarídeos extraídos de outras fontes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar estruturalmente polissacarídeos extraídos dos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc e avaliar o potencial anti-inflamatório desses polímeros *in vitro*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extrair os polissacarídeos dos vinhos Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Sauvignon Blanc;
2. Purificar os polissacarídeos;
3. Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos obtidos por GC-MS, RMN e HPSEC-MALLS;
4. Comparar os polissacarídeos encontrados nos vinhos;
5. Fornecer um “*fingerprint*” de polissacarídeos por RMN e GC-MS para cada vinho analisado;
6. Avaliar o efeito das frações no metabolismo celular da linhagem RAW- Blue;
7. Avaliar a capacidade das frações estudadas de interferirem no processo inflamatório *in vitro*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. UVA

A baga da uva é composta pela casca, polpa e sementes (Figura 1); e a estrutura do cacho de uva é fornecida pela ráquis, a qual tem a função de sustentar as bagas. A ráquis contém grande quantidade de água (75%), além de taninos (3%), os quais conferem um sabor áspero e adstringente (BORGES, 2008). Para evitar a transferência desse sabor ao vinho é comum eliminar o contato dessas estruturas com o mosto para que não haja interferência negativa na composição química do mesmo (RIZZON; MENEGUZZO; MANFROI, 2004).

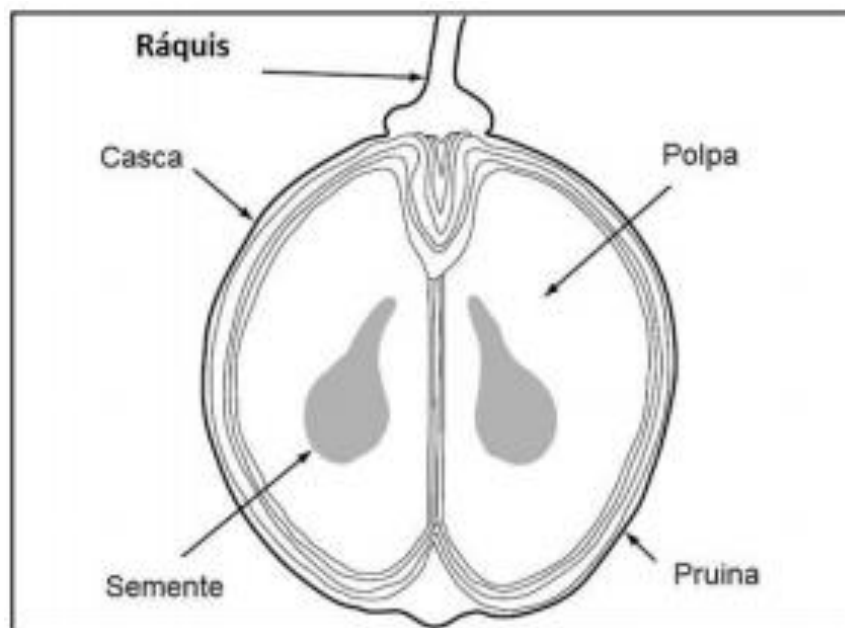


FIGURA 1: Estrutura da baga da uva. FONTE: GRAINGER; TATTERSALL, 2005.

As cascas ou películas contêm matéria corante e compostos odoríferos, além de polifenóis. Na superfície externa da casca está a pruína que é uma camada de substância cerosa onde ficam aderidos micro-organismos (exemplo, leveduras

alcoologênicas e bactérias lácticas), os quais conduzem a fermentação espontânea do mosto (KUHN, 2003). Os polifenóis encontrados nas cascas podem ser divididos em dois grupos: 1) antocianidinas (encontradas apenas nas uvas tintas) e flavonas (encontradas nas uvas brancas) que dão às uvas sua coloração característica e também dão origem a substâncias antioxidantes (por exemplo, resveratrol); 2) taninos, presentes em maiores quantidades nos vinhos tintos devido a maior utilização das cascas no processo de vinificação quando comparados aos vinhos brancos ou rosés (GRAINGER; TATTERSALL, 2005).

A polpa representa 4/5 do peso da baga e é composta por água, açúcares, ácidos, proteínas e minerais. Os principais açúcares encontrados na uva são a frutose e a glucose. Já os ácidos mais importantes encontrados na baga verde são o ácido tartárico e o málico, sendo que durante o amadurecimento da fruta o ácido tartárico torna-se o principal. Quanto aos minerais, o potássio é o que se apresenta em maior quantidade (2.500 mg/L), já a concentração dos demais (exemplo, cálcio e magnésio) não ultrapassa 200 mg/L cada (GUERRA, 2003; GRAINGER; TATTERSALL, 2005).

As sementes variam em tamanho e formato de acordo com a variedade da uva. Na sua composição encontram-se taninos e óleo vegetal. Portanto, o esmagamento e/ou prensagem da uva deve ser cuidadoso para que estas sementes não sejam rompidas e liberem excessivamente o seu conteúdo (especialmente o tanino) que pode ser prejudicial ao produto final. Isto porque os taninos oriundos das cascas já são suficientes para o papel de limpidez e conservação que exercem no produto final, sem esquecer a contribuição destes ao sabor do vinho (BORGES, 2008).

À medida que amadurecem, as uvas passam por mudanças de forma e de composição, como o ganho de açúcar, a queda da acidez, o aumento de volume e de peso, a mudança de coloração e o enriquecimento dos aromas. O tempo da colheita é provavelmente a mais importante decisão na viticultura, pois a qualidade da uva é indispensável para a qualidade do vinho (GUERRA, 2003).

### 3.1.1. Tipos de videira

Mundialmente existem milhares de variedades de uva. A maioria delas pertence à espécie *Vitis vinifera*, originária do Cáucaso entre 7.000 e 5.000 a.C., de onde foi difundida por toda a costa mediterrânea, seja para a produção de fruta para consumo *in natura*, seja como matéria-prima para a elaboração de vinhos. Entre as variedades dessa espécie estão as conhecidas uvas tintas Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Pinot Noir, Syrah e Tannat e, entre as uvas brancas, destacam-se a Chardonnay, Sauvignon Blanc, Prosecco e Riesling. Algumas delas se difundiram pelo mundo em virtude da sua capacidade de adaptação e pelas características dos vinhos que originam. Outras, de adaptação mais restrita, permaneceram em suas regiões de origem, proporcionando aos seus habitantes a oportunidade de elaboração de produtos típicos e exclusivos (GUERRA *et al.*, 2009).

O Brasil pertence ao chamado novo mundo vitivinícola, juntamente com Chile, Argentina, Estados Unidos, África do Sul, Austrália e outros, cuja base de produção são de variedades importadas dos tradicionais países produtores de vinhos da região mediterrânea. Algumas variedades se adaptaram muito bem as novas condições climáticas a que foram expostas nos novos países vitivinícolas. Como exemplo pode-se citar a Riesling Itália e a Cabernet Sauvignon nas condições da Serra Gaúcha (GUERRA *et al.*, 2009).

As uvas oriundas de videiras *Vitis vinifera*, cultivares europeus, são comumente usadas na elaboração de vinho pelo mundo, principalmente na Europa. Nos Estados Unidos, espécies como a *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis aestivalis*, *Vitis rupestris* e *Vitis rotundifolia* são as mais usadas para a vinificação (YANG; MARTINSON; LIU, 2009). As frutas destas últimas espécies contêm menos açúcar que as oriundas de espécies *Vitis vinifera*. Desta forma, seus vinhos também não apresentam uma alta qualidade (ESTREICHER, 2006).

### 3.2. VINHO

O vinho é uma das primeiras criações da humanidade e ocupou um lugar privilegiado em inúmeras civilizações. Ele representa também uma série de

descobertas ligadas às primeiras reações químicas encontradas pelo homem: fermentação e oxidação. É impossível saber quem foi o primeiro vinhateiro, grandes civilizações como Grécia e Roma antigas situam a origem do vinho em sua pré-história (LAROUSSE DO VINHO, 2007).

Devido aos açúcares encontrados nas bagas e ao sumo abundante, a uva é a única fruta que apresenta tendência natural a fermentar e produzir álcool. Basta que a uva esteja madura e que seu sumo entre em contato com leveduras presentes naturalmente na casca das bagas. A videira pertence à família das *ampelídeas*, cujo aparecimento remonta há aproximadamente 120 milhões de anos, no hemisfério norte. E, há cerca de 60 milhões de anos, surgiram as espécies *Vitis vinífera* e as genericamente chamadas de americanas, como *Vitis labrusca* e *Vitis riparia*. Sementes de vinha cultivada com mais de 7 mil anos foram descobertas no Cáucaso, a leste do mar Negro. Assim, o primeiro vinhedo foi plantado em algum lugar entre as atuais Turquia, Geórgia ou Armênia (LAROUSSE DO VINHO, 2007).

O aspecto essencial no primeiro período de história do vinho é que devido ao uso religioso, o vinho acabou se transformando em um dos elementos importantes da civilização ocidental. Na Idade Média, os cistercienses da Borgonha foram os primeiros a estudar o solo da *Côte d'Or*, experimentando a poda, escolhendo as videiras que davam as uvas mais maduras e selecionando as melhores plantas, o que permitiu a expansão dos vinhedos e do comércio de vinhos (LAROUSSE DO VINHO, 2007).

Grandes quantidades de vinhos passaram a ser comercializados. No século XIV, as exportações de Bordeaux para a Inglaterra eram tão importantes que sua média anual só foi superada em 1979. O rei Eduardo II da Inglaterra encomendou o equivalente a mais de 1 milhão de garrafas para o seu casamento com Isabel da França, no ano de 1308. Sob o reinado de Elizabeth I, quase três séculos mais tarde, os ingleses bebiam mais de 40 milhões de garrafas de vinho por ano, para uma população que na época contava 6,1 milhões de habitantes (LAROUSSE DO VINHO, 2007).

Com crescimento do comércio do vinho, a ciência passou a ocupar papel importante na viticultura, e desenvolveram-se programas de pesquisa sobre a vinha, a fermentação e o envelhecimento em adega. Paralelamente, o consumo do vinho

disseminou para o mundo inteiro. Com isso, novos países produtores chegaram ao mercado, ocorrendo a ascensão de países do Novo Mundo, que atualmente competem em qualidade e quantidade com os vinhos europeus (LAROUSSE DO VINHO, 2007).

### 3.2.1. Processo de produção do vinho

O vinho de qualidade é produzido, geralmente com uvas da espécie *Vitis vinifera*, que são específicas para essa utilização, pois acumulam mais açúcares do que as “comuns”. Com o maior acúmulo de açúcares, melhor é a fermentação do mosto, desde que as uvas viníferas sejam produzidas de forma correta obedecendo as características de solo, clima e as diversas técnicas viticultoras sejam respeitadas conforme o tipo de cada uva. Para formar novos paladares nos vinhos esses tipos de uvas podem ser misturados uns com os outros originando uma combinação de sabores e aromas (CRUZ, 2006; HOFFMAN, 2009).

Os vinhos tintos são produzidos a partir de uvas tintas, já os vinhos brancos, são geralmente elaborados a partir de uvas brancas, mas também podem ser produzidos com uvas rosadas e tintas. Para isso, é necessário separar imediatamente a fase líquida da sólida, que contém os pigmentos responsáveis pela cor (CRUZ, 2006; HOFFMAN, 2009).

O processo de produção do vinho inicia-se com a colheita seguida da recepção das uvas, esmagamento e desengace, fermentação, clarificação, filtração, envelhecimento, engarrafamento e rotulagem, análises do vinho e resíduos (figura 2) (CRUZ, 2006; HOFFMAN, 2009).

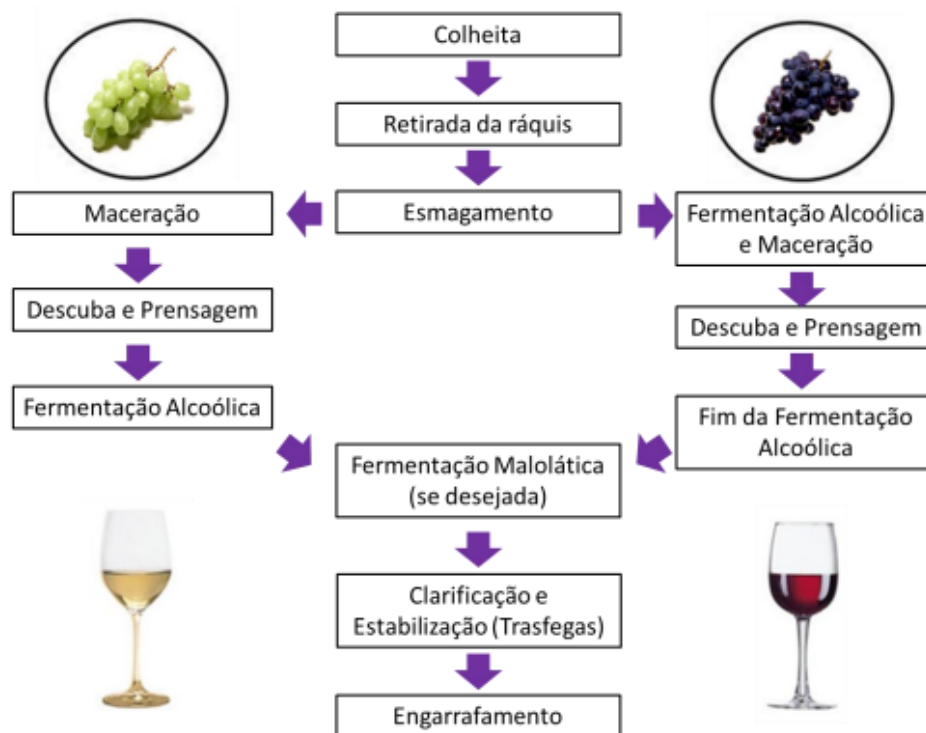


FIGURA 2: Fluxograma da produção do vinho tinto e branco. FONTE: AGUSTINI, 2011.

Portanto, as etapas detalhadas para a produção do vinho, segundo Cruz (2006), são:

- Colheita e recepção das uvas: a uva deve ser colhida no mesmo dia de seu processamento ou no máximo um dia antes, a não ser que a vinícola disponha de câmara fria para armazená-la por alguns dias antes da vinificação. Ela tem de chegar à vinícola em ótimo estado de sanidade e de maturação.
- Desengace e esmagamento: a uva deve ser desengaçada de forma lenta para não triturar a ráquis, pois sabores indesejáveis nela presentes podem passar ao vinho. O esmagamento deve ser feito para liberar somente o mosto.
- Prensagem: após o esmagamento, a uva passa pela prensa pneumática para separar a parte sólida da parte líquida.
- Sulfitação: O gás anidrido sulfuroso -  $\text{SO}_2$  (aditivo INS 220) - é um agente antioxidante que absorve oxigênio livre do mosto pelo seu alto potencial redutor,

impedindo o crescimento de micro-organismos aeróbicos. É adicionado ao mosto pelo seu poder antibacteriano e para selecionar as leveduras desejáveis, retirando a flora natural do fruto, além de outros micro-organismos indesejáveis e nocivos.

- Fermentação alcoólica: é provocada por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), que estão naturalmente na parte externa da película da uva, mas atualmente algumas vinícolas adicionam outras leveduras selecionadas. Elas transformam os açúcares da uva, frutose e glucose, principalmente em etanol e dióxido de carbono. O controle de temperatura é realizado de modo a mantê-la de acordo com o tipo de vinho que será elaborado.
- Fermentação malolática: nessa etapa o ácido málico se transforma em ácido láctico, menos ácido e menos agressivo, dando sabores mais agradáveis ao vinho. Geralmente é feita apenas nos vinhos tintos.
- Trasfega: terminada a fermentação, o vinho é separado da borra através da passagem para outro recipiente, separando o resíduo que fica no fundo do tanque.
- Clarificação e filtração: clarificantes orgânicos ou minerais agem por adsorção eletrostática sobre as partículas, ocorrendo arraste e conseqüente floculação destas. Em seguida, é feita a filtração.
- Envelhecimento: essa etapa é realizada apenas com vinho tinto. O envelhecimento do vinho pode ser feito em tanque de inox, em barrica de carvalho e na garrafa. O tempo e a forma de envelhecimento do vinho dependem da variedade da uva, de seu processo de elaboração, do tipo e da estrutura do produto que se deseja, da safra e do valor agregado que terá esse vinho.
- Engarrafamento: o vinho é engarrafado em máquinas especiais que impedem o contato com ar, evitando oxidações e contaminações.

As principais variedades de origem *Vitis vinifera* utilizadas na produção de vinho são: Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Carignan, Sauvignon Blanc, Carmenère, Malbec, Merlot, Monastrell, Pinot noir, Tannat, Tempranillo, Brunello de Moltaccino, Chianti, Mastro Rosso Lambrusco, Primitivo da Liguria, Chardonay, Abelhal, Albillo, Alvarinho, Bouvier, Chenin Blanc, Colombard, Furmint, Gewürztraminer, Harslevelu, Malvasia e Moscatel (Rudge e Gomide, 2010). Nesse

trabalho foram escolhidas as castas Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc para serem analisadas.

#### 3.2.1.1. Cabernet Franc

Cabernet Franc é uma casta de uva tinta da espécie *Vitis vinífera* originária da França (figura 3). Essa casta é usada principalmente em cortes com outras uvas, para incluir sabor e textura, e para produção do vinho tinto Cabernet Franc (SULLIVAN, 1998; ROBINSON, 2006).

Esse tipo de uva apresenta cachos pequenos e de cor violeta profunda. As suas bagas também são pequenas, redondas, delicadas e de casca mais fina que a Cabernet Sauvignon. Floresce e amadurece mais cedo e se adapta a quase todas as regiões. É uma casta fácil de cultivar, pode ser cultivada tanto em regiões quentes quanto frias (SULLIVAN, 1998; CHRISTENSEN *et al.*, 2003; ROBINSON, 2006).

A França tem a maior plantação de Cabernet Franc do mundo, com mais de 35.000 ha. Além da França, pode ser encontrada em regiões com clima tropical, como Tanzânia e Indonésia, e outros países com produções menores, como Paquistão e Turquia. Também é encontrada em países como Canadá, Estados Unidos, Chile e Argentina (ROBINSON, 2006; LEWIN 2010). No Brasil, foi muito cultivada até a década de 70, quando passou a ser substituída por outras variedades, como Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Trapanillo, Chardonnay e Sauvignon Blanc (COPELLO, 2008).



FIGURA 3: Uva Cabernet Franc. FONTE: ROBINSON, 2006.

#### 3.2.1.2. Sauvignon Blanc

A Sauvignon Blanc é uma casta de uva branca da espécie *Vitis vinifera*, também chamada de Blanc Fumé ou Sauvignon Jaune e tem sua origem em Bordeaux, na França (figura 4). É considerada uma das uvas finas mais nobres do mundo, é utilizada para a produção do vinho branco Sauvignon Blanc (SULLIVAN, 1998; CHRISTENSEN *et al.*, 2003).

Essa casta possui bagas claras, casca fina e amadurece cedo, o que permite um bom desempenho em climas quentes, quando não expostos ao calor extremo. A França é a maior produtora da Sauvignon Blanc, mas também existem grandes plantações na Califórnia, Austrália, Chile e África do Sul (ROBINSON, 2006; LEWIN 2010).



FIGURA 4: Uva Sauvignon Blanc. FONTE: ROBINSON, 2006.

### 3.2.1.3. Cabernet Sauvignon

Cabernet Sauvignon também é uma casta de uva tinta da espécie *Vitis vinífera* (figura 5). É a casta mais plantada e de maior prestígio no mundo, a qual é utilizada para produção do vinho tinto Cabernet Sauvignon. Sua origem está associada à região de Bordeaux (Médoc) e é resultado do cruzamento entre as castas: Cabernet Franc e Sauvignon Blanc. Com baixo rendimento, essa cepa só é cultivada onde se deseja obter um vinho de qualidade (SULLIVAN, 1998; CHRISTENSEN *et al.*, 2003; ROBINSON, 2006).

A uva Cabernet Sauvignon possui as bagas escuras, pequenas e com casca espessa: pouca polpa e muita casca. Apresenta uma maturação tardia que limita seu uso nas zonas temperadas com outonos amenos, ao contrário da uva Cabernet Franc, que amadurece mais cedo (SPURRIER *et al.*, 1983; CHRISTENSEN *et al.*, 2003; ROBINSON, 2006).

Essa cepa é cultivada em vários lugares do mundo. A França possui a melhor região produtora dessa cepa (50.000 ha), seus vinhos estão entre os melhores do mundo. A Califórnia possui 26.000 ha de Cabernet Sauvignon e produz inúmeros vinhos de qualidade. A Austrália é a terceira maior produtora do mundo, com 22.000 ha da uva. Há mais de um século, o Chile tem vinhedos de Cabernet Sauvignon (21.000 ha), nos quais são obtidos excelentes vinhos (ROBINSON, 2006; LEWIN 2010). Hoje, a Cabernet Sauvignon é a principal uva tinta vinífera do Brasil, sendo

cultivada principalmente na região sul, onde existe a maior produção de vinhos do país (COPELLO, 2008).



FIGURA 5: Uva Cabernet Sauvignon. FONTE: ROBINSON, 2006.

### 3.2.2. Benefícios do vinho

O vinho é uma bebida obtida exclusivamente a partir da fermentação alcoólica do mosto da uva. Apresenta grande complexidade química devido à natureza dos seus constituintes. O hábito do consumo moderado de vinho é benéfico à saúde do consumidor, e participa da dieta da população de muitos países (AMERINE *et al.*, 1977; ABAD *et al.*, 1993; SCHINI-KERTH, 2003; 2005; NDIAYE *et al.*, 2004).

Entre os efeitos favoráveis, quando consumido moderadamente destaca-se a capacidade de favorecer a formação em maior quantidade do “bom colesterol” (HDL); o efeito para combater os radicais livres; o efeito antimicrobiano, antiviral, diurético e eupéptico (ABAD *et al.*, 1993).

O vinho contém ácidos orgânicos presentes na forma livre ou de sais, entre os quais se destacam o tartárico, o málico, o cítrico e o láctico. O ácido tartárico é o ácido característico do vinho, sendo que a videira é a única planta na natureza que o produz em quantidade elevada, possibilitando a extração comercial. Esses ácidos determinam no vinho um pH variável de 3,0 a 3,8 que lhe confere um efeito antisséptico e um poder eupéptico. Isto é, o vinho favorece a ação da pepsina, que

no suco gástrico apresenta atividade ótima a pH 2,0. Por esta razão auxilia na hidrólise das proteínas, aumentando a capacidade digestiva (BOURZEIX *et al.*, 1989; ABAD *et al.*, 1993; ADRIAN *et al.*, 2000).

Os elementos minerais do vinho representam em média 2,0 g/L e aproximadamente 10% do teor do extrato seco reduzido. O potássio é o cátion mais importante do vinho. Os sais de potássio contribuem na propriedade diurética dos vinhos. Por ser um cátion fisiologicamente muito ativo, exerce papel fundamental no interior da célula viva, mantendo o ambiente alcalino. A relação potássio/sódio elevada do vinho é importante sob o aspecto fisiológico. O ferro, embora presente no vinho em pequena quantidade, 3,0 a 4,0 mg/L é um elemento benéfico à saúde e encontra-se no vinho na forma de ferro ferroso, mais facilmente absorvível (BOURZEIX *et al.*, 1989; ADRIAN *et al.*, 2000).

Os ácidos fenóis são encontrados na uva na forma de combinação tipo éster e são liberados por hidrólise alcalina. São divididos em dois grupos: os ácidos benzóicos e os ácidos cinâmicos. Os ácidos benzóicos são os mais difundidos e são caracterizados por apresentar, juntamente com as antocianinas do vinho, efeito antisséptico. Os ácidos cinâmicos são encontrados no vinho na forma livre e salificada, participam da ação antioxidante e apresentam também efeito antisséptico (BOURZEIX *et al.*, 1989; ADRIAN *et al.*, 2000; JANNIN *et al.*, 2001).

Os taninos, flavonóis e estilbenos são compostos fenólicos presentes em maior quantidade nos vinhos envelhecidos. Os taninos favorecem a digestão e os flavonóis têm sido estudados devido ao seu poder antioxidante e efeito protetor em relação aos radicais livres. No grupo dos estilbenos encontra-se o resveratrol, que é uma fitoalexina. O resveratrol tem sido muito estudado devido à sua interação com as doenças da videira e devido ao provável efeito protetor contra doenças cardiovasculares. Na uva, o resveratrol encontra-se na película, e o vinho tinto apresenta maior quantidade, devido ao processo de elaboração. A concentração de resveratrol no vinho varia de 1,3 a 7,0 mg/L (BOURZEIX *et al.*, 1989; ADRIAN *et al.*, 2000; JANNIN *et al.*, 2001).

No entanto, recentemente, Chiu-Tsun Tang e colaboradores (2014) revisaram os estudos já realizados com o resveratrol e seus efeitos biológicos e concluíram que após mais de 20 anos de investigação ainda não existe comprovação de

atividade biológica desse composto em humanos. Apenas um estudo de tamanho razoável realizado em humanos sugeriu que o resveratrol apresenta atividade anti-inflamatória em pacientes com doenças cardiovasculares (TOME-CARNEIRO *et al.*, 2013). Fora isso, praticamente todas as evidências disponíveis são provenientes de pesquisas com culturas de células e com animais. Um estudo feito por Rotches-Ribalta e colaboradores (2012) revelou que os compostos fenólicos do vinho (incluindo o resveratrol) são muito pouco biodisponíveis, portanto, a bioatividade encontrada, pode ser devido aos metabólitos do resveratrol e não dele mesmo, o que pode ser a razão por trás dos resultados inconclusivos em humanos.

### 3.2.3. Carboidratos dos vinhos

Os carboidratos são um dos principais constituintes químicos da maioria dos tecidos e células dos organismos (SIMÕES *et al.*, 2003). Eles existem como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados (AVIGAD e DEY, 1997). De acordo com a sua função, os carboidratos podem ser classificados em dois grandes grupos: estruturais e de reserva. Os carboidratos estruturais são responsáveis pela formação da parede celular e de outras estruturas, sendo considerados os compostos orgânicos mais abundantes da Terra (REID, 1997).

Os carboidratos presentes no vinho são derivados tanto das paredes das células de micro-organismos quanto das uvas (VIDAL *et al.*, 2003). Os originários das paredes celulares de uva incluem as arabinogalactanas, ramnogalacturonanas e homogalacturonanas, enquanto que aquelas originadas a partir de paredes das células de levedura são principalmente glucanas, mananas e manoproteínas (WATERS *et al.*, 1994; PELLERIN *et al.*, 1995; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013).

#### 3.2.3.1. Parede celular vegetal e polissacarídeos

A parede celular vegetal é uma estrutura resistente, flexível e as vezes muito rígida, que envolve externamente as células de vegetais superiores, salvo algumas

exceções (REID, 1997). Ela apresenta função na comunicação célula-célula, controla o crescimento celular, protege a célula do ataque de patógenos e predadores (BRETT e WALDRON, 1990).

As paredes de células adjacentes se encontram numa linha divisória chamada lamela média, que confere forte aderência célula-célula (REID, 1997). A parede celular é dividida em: primária, não lignificada, com células jovens que ainda mantêm a capacidade de divisão e alongamento, apresentam uma parede celular muito fina, com 0,1 a 1  $\mu\text{m}$  de espessura; e secundária, lignificada, com células sem capacidade de crescimento e divisão, que conferem rigidez aos tecidos (REID, 1997).

A parede celular dos vegetais é altamente organizada e constituída de polissacarídeos, proteínas e substâncias aromáticas. Os polissacarídeos são os principais componentes da parede celular e são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose, como pode ser observado na figura 6 (CARPITA e McCANN, 2000). A parede celular primária é composta de 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% pectina e 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos. Já a parede celular secundária, muito mais espessa que a parede primária, possui de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e quantidade mínima de pectina (DEY *et al.*, 1997).

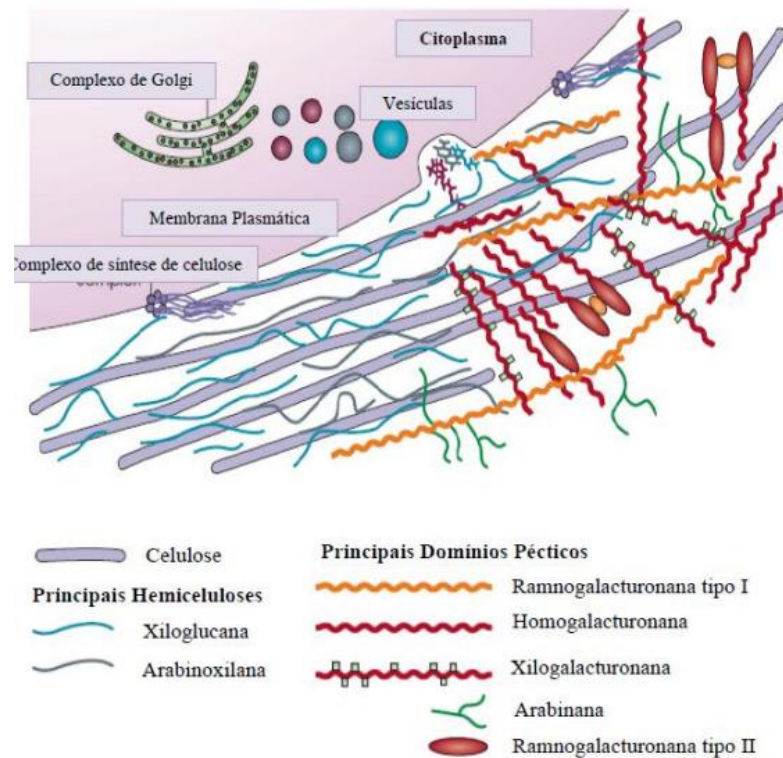


FIGURA 6: Modelo da estrutura da parede celular primária de vegetal. FONTE: Adaptado de COSGROVE, 2005.

As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem juntamente com a celulose, são constituídas de unidades monossacarídicas de D-manose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, D-xilose, ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metilglucurônico e podem apresentar ainda grupamentos O-acetil ligados às unidades pertencentes às cadeias principal e/ou lateral (ASPINALL, 1959; FENGEL e WEGNER, 1989). Esses monossacarídeos formam diferentes polissacarídeos que podem ser incluídos nas classes arabinogalactanas, glucuronoxilanas arabinoxilanas, xilanas, galactoglucomananas, galactomananas, glucuronomananas, glucomananas, mananas e xiloglucanas (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990; PULS e SCHUSEIL, 1993; KACURÁCOVÁ *et al.*, 2000). Alguns estudos já relataram a presença arabinogalactanas e mananas no vinho (PELLERIN *et al.*, 1995; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013).

As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. O termo pectina refere-se a polissacarídeos complexos que contém unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico (GalA). Os principais representantes são: ramnogalacturonas do tipo I (RG I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG II) e homogalacturonanas (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990; CARPITA e GIBEAUT, 1993). Dentre elas, as RG I e RG II já foram relatadas em estudos feitos com o vinho (PELLERIN *et al.*, 1995; MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013).

#### 3.2.3.1.1. Arabinogalactanas

As arabinogalactanas são polímeros complexos presentes na maioria das plantas superiores (FINCHER *et al.*, 1983). Esses polissacarídeos já foram isolados de diversas estruturas dos vegetais (folhas, caules, raízes, flores, sementes, gomas e exsudados) (FINCHER *et al.*, 1983; MENESTRINA *et al.*, 1998; DELGOBO *et al.*, 1998, 1999; MELLINGER *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2006).

Segundo Aspinall (1973), esses polímeros podem ser classificados em dois grupos de acordo com as ligações químicas da cadeia principal: arabinogalactanas do tipo I (AG I) e arabinogalactanas do tipo II (AG II).

As arabinogalactanas do tipo I apresentam cadeia principal formada por (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactanas. São pouco ramificadas e, na maioria das vezes, apresentam unidades de arabinose ligadas no O-3 das unidades de galactose da cadeia principal (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

As arabinogalactanas do tipo II são altamente ramificadas, possuem cadeia principal formada por (1 $\rightarrow$ 3) e/ou (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactanas ligadas umas as outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6 e apresentam a maior parte das posições O-3 e O-6 restantes ocupadas por unidades de arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Embora apresentem uma estrutura geral semelhante, a estrutura fina das arabinogalactanas do tipo II varia muito entre as espécies (CARPITA e GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM *et al.*, 1996).

### 3.2.3.1.2. Ramnogalacturonanas

As ramnogalacturonanas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico e ramnose (REID, 1997). Esses polímeros podem ser classificados em dois grupos: ramnogalacturonana do tipo I (RG I) e ramnogalacturonana do tipo II (RG II).

As ramnogalacturonanas do tipo I são heteropolímeros formados por cadeia principal constituída de unidades alternadas de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico ligadas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e unidades de  $\alpha$ -L-ramnose ligadas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2). Esses polímeros podem ser estendidos por ácido poligalacturônico em seus terminais e as unidades ramnosil podem interromper longos períodos de ácido poligalacturônico (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

As unidades de ramnose podem servir como pontos de ramificação da estrutura principal, podendo variar sua quantidade conforme o tipo celular e o estado fisiológico da planta. Devido a essa frequência variável de unidades de ramnose, existem estruturas mais ramificadas que outras (REID, 1997). As cadeias laterais desse tipo de polímero são constituídas principalmente de estruturas formadas por unidades de açúcares neutros, tais como as arabinanas, as galactanas e as arabinogalactanas (McNEIL *et al.*, 1984; KOMALAVILAS e MORT, 1989). Além disso, até um terço das unidades de ácido galacturônico pode ser acetilada na posição O-3 (KOMALAVILAS e MORT, 1989). Alguns estudos também identificaram a presença de grupamento acetil substituindo o C-2 das unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico em RG I (LEROUGE *et al.*, 1993).

A ramnogalacturonana do tipo II é o polissacarídeo péctico mais complexo, porém o que apresenta a estrutura mais conservada. A característica mais marcante dessa molécula é possuir açúcares raros. São polímeros altamente substituídos que apresentam cadeia principal constituída por unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico unidas por ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 4) (O'NEILL *et al.*, 1990). Esses polissacarídeos apresentam cadeias laterais geralmente substituídas em C-2 das unidades de  $\alpha$ -D-GalpA e seus substituintes são formados por oligossacarídeos contendo monossacarídeos raros como apiose, 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose, ácido acérico, Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico), Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heotulosárico) entre outros, formando estruturas altamente complexas (CARPITA e

GIBEAUT, 1993; REID, 1997; PÉREZ; MAZEAU; PENHOAT, 2000; PAULSEN; BARSETT, 2005; ATMODJO *et al.*, 2013).

### 3.2.3.2. Parede celular de leveduras e polissacarídeos

Leveduras são fungos que possuem a mesma estrutura subcelular de células animais e vegetais (OSUMI, 1998). São micro-organismos unicelulares, com tamanho que varia de 5 a 10 microns. As espécies variam entre si segundo a morfologia ou forma, metabolismo com relação a diferentes substratos, modo de reprodução e onde são encontrados. Enquanto existem aproximadamente 50.000 espécies de fungos, existem apenas 60 gêneros diferentes de leveduras, com aproximadamente 500 espécies diferentes (STONE & MILLS, 2006).

A parede celular está situada em sua superfície exterior e desempenha papel importante no transporte de moléculas para dentro e fora da célula (OSUMI, 1998). Ela é resistente, durável e elástica, a espessura da parede pode variar entre 150 a 400 nm, dependendo da espécie e das condições de cultivo do micro-organismo. A função básica é a de proteger o protoplasma que envolve e confere formato único à célula através da sua organização macromolecular (ROBINOW & JOHNSON, 1991).

A parede celular da levedura é constituída por aproximadamente 40% de  $\beta$ -glucanas, 40% de  $\alpha$ -mananas, 8% de proteínas, 7% de lipídios, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina (HOUGH, 1990). Os principais monossacarídeos presentes nos polímeros são a glucose e a manose, seguidos pela galactose, xilose, N-acetil-D-glucosamina, ácidos urônicos e outros componentes secundários. A composição química qualitativa da parede celular é característica de cada espécie, podendo ser empregada como marcador taxonômico (FARKAS, 1989).

A principal levedura responsável pela fermentação na produção do vinho é a *Saccharomyces cerevisiae*, a qual possui em sua parede celular cerca de 10-20% de proteínas e lipídios e 80-90% de carboidratos, dos quais 50% são glucanas e mananas (NORTHCOTE e HORNE, 1952; BARTNICKI-GARCIA e LIPPMAN, 1982; VUKOVIC *et al.*, 1994). Segundo Vukovic (1994), a *S. cerevisiae* apresenta a parede

celular em camadas, sendo as cadeias de mananas externas e as glucanas, internas. Já foi demonstrada a presença de mananas entre os polissacarídeos encontrados no vinho (MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013).

#### 3.2.3.2.1. Mananas

A manana é um dos polissacarídeos de maior importância da parede celular da levedura, responsável por eventos de reconhecimento célula-célula, além de limitar o acesso de agentes líticos às porções mais internas da parede celular e à membrana celular (KLIS, *et al.*, 2002).

Há evidências de que as mananas juntamente com os peptídeos complexos constituem a camada mais externa da parede celular das leveduras (BALLOU, 1970; CABIB, 1975). Esse polissacarídeo é altamente ramificado, contendo uma cadeia principal constituída por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) substituída nas posições O-2 por cadeias laterais de unidades de  $\alpha$ -D-manopirranose ou oligossacarídeos com unidades de manose (1 $\rightarrow$ 2) e (1 $\rightarrow$ 3) ligadas (STEWART e BALLOU, 1968; BARRETO BERTGER e GORIN, 1983; HALÁSZ e LÁSZTITI, 1991).

### 3.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO E POLISSACARÍDEOS

A reação da imunidade natural, ou inflamação, é uma resposta do organismo a estímulos nocivos. Essa ação protetora é obtida principalmente pelo recrutamento rápido de leucócitos do sangue para o local da inflamação (diapedese), seguida por uma cascata de reações bioquímicas que se propagam e iniciam a resposta inflamatória (figura 7) (NAKAMURA *et al.*, 1992; LASKY, 1992; VARKI, 1997; SIMON *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2002; MULLER, 2003; YADAV *et al.*, 2003; PARISH, 2006; LI & VLODAVSKY, 2009).

Com o estímulo inflamatório, os mastócitos residentes liberam histamina, enquanto que os macrófagos residentes ativam fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e proteína ativadora -1 (AP-1), e liberam as citocinas pró-

inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), e quimiocinas que ativam as etapas da migração leucocitária ( figura 7a). A aderência e o rolamento de leucócitos no endotélio ativado pelo estímulo inflamatório envolvem selectinas de linfócitos, plaquetas e células endoteliais (L-, P-, e E-selectinas, respectivamente) e seus ligantes (MULLER, 2003; YADAV *et al.*, 2003).

Os neutrófilos são parcialmente ativados pelo TNF levando a liberação de pequenas quantidades de elastase, clivando o revestimento e expondo integrinas (moléculas transitórias de adesão presentes nos leucócitos) que permitem uma ligação mais forte à matriz extracelular. Após a aderência, os leucócitos ativados atravessam a superfície vascular, utilizando a ação de enzimas (metaloproteinases, heparanases e elastases) que degradam a membrana basal, e na presença de quimioatraentes, moléculas solúveis como produtos bacterianos (lipopolissacarídeos - LPS, por exemplo) e citocinas, migram até o local da inflamação (figura 7b) (MULLER, 2003; YADAV *et al.*, 2003; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

Um processo importante para a inflamação é a fagocitose dos patógenos através da ativação dos monócitos em macrófagos. Quando a ativação é obtida através do IFN- $\gamma$ , é conhecida como via clássica da ativação de macrófagos e promove a expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12 (MULLER, 2003; YADAV *et al.*, 2003). O processo de fagocitose culmina com o evento denominado explosão respiratória, ao qual induz a formação de espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species* – ROS) e nitrogênio (principalmente óxido nítrico – NO, um vasodilatador endógeno) a fim de se eliminar o patógeno fagocitado. Devido ao fato de induzir reações tóxicas no hospedeiro e ser altamente produzido durante a inflamação, NO pode ser considerado um agente pró-inflamatório ou anti-inflamatório dependendo da sua concentração. O NO pode ainda atuar através de efeitos inibitórios ou apoptóticos nas células agindo como agente anti-inflamatório (YADAV *et al.*, 2003; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

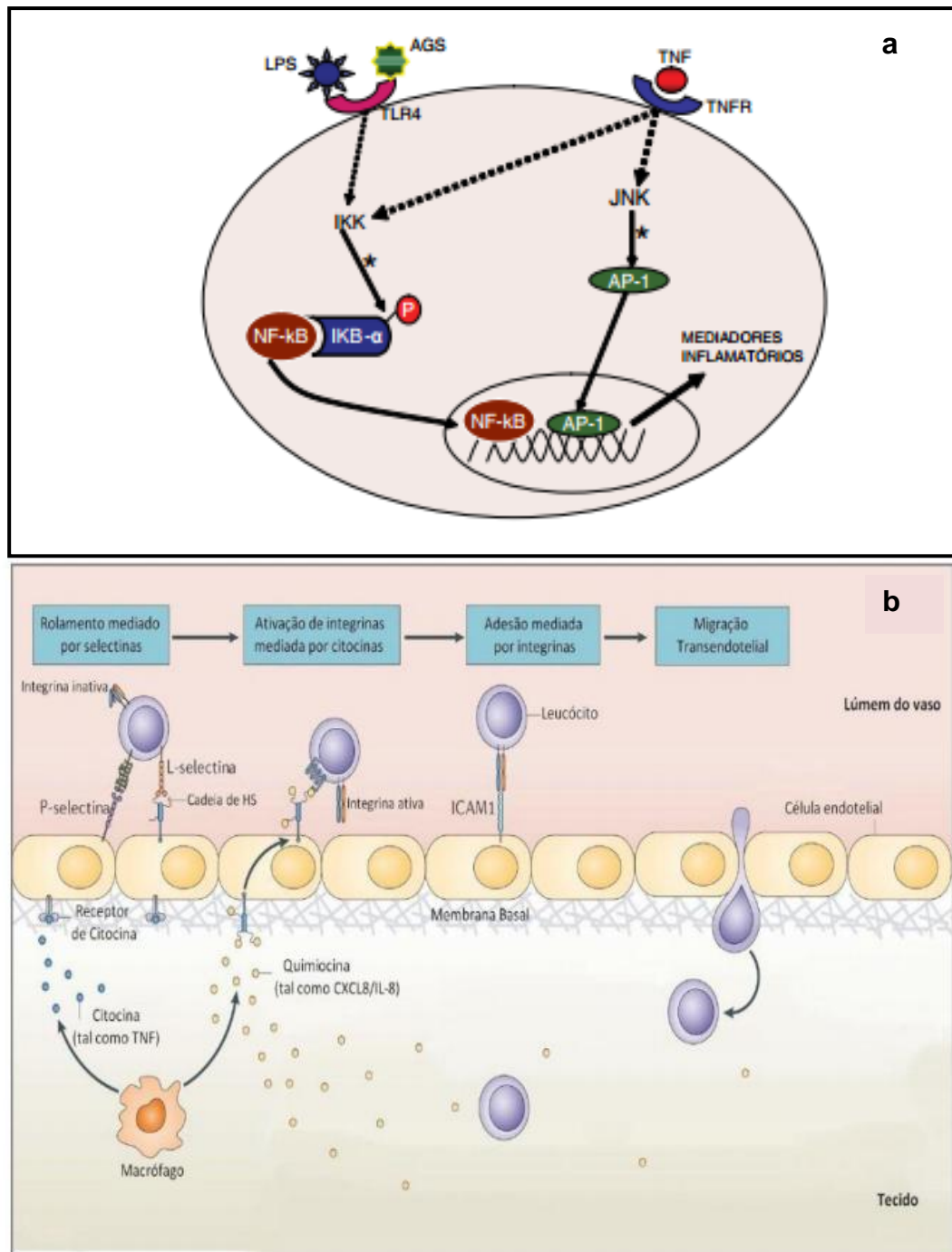


FIGURA 7: a) Ativação dos macrófagos através das vias de sinalização dos fatores de transcrição NF-κB e AP-1. A presença de lipopolissacarídeos (LPS) e de ácidos graxos saturados (AGS) estimula a via de sinalização do fator de transcrição NF-κB, enquanto a presença de TNF-α estimula tanto a via de sinalização do NF-κB quanto AP-1. A ativação dessas vias resulta no aumento da expressão de genes que

codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória. FONTE: BASTOS, 2009. b) Recrutamento de leucócitos e processo inflamatório. Os macrófagos residentes são ativados através da sinalização dos fatores de transcrição e fagocitam o agente invasor, liberando citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1), os quais ativarão as células do endotélio. O endotélio ativado expõe selectinas que apresentam afinidade á glicoproteínas presentes na membrana plasmática dos leucócitos. Com isso, ocorre um processo de marginalização, rolamento e aderência dos leucócitos pela parede do vaso. Após a aderência, os leucócitos ativados atravessam a superfície vascular e migram até o local da inflamação. FONTE: Adaptado de PARISH, 2006.

Diversos trabalhos foram realizados e, as atividades biológicas mais comumente atribuídas aos carboidratos de diversas fontes são: atividade anti-inflamatória, antitumoral, antiviral e anticoagulante (BOHN e MILLER, 1995; CAPEK et al., 2003; RENARD *et al.*, 2005, CIPRIANI *et al.*, 2006, 2009; SIMAS-TOSIN *et al.*, 2012; DARTORA *et al.*, 2013).

Noletto e colaboradores (2002, 2004) caracterizaram a complexação de uma manana de *Saccharomyces cerevisiae* e uma galactomanana de líquen com o íon vanadilo. Ambos os polissacarídeos, complexados e não complexados, apresentaram atividade anti-inflamatória em macrófagos peritoneais de camundongos.

As  $\beta$ -glucanas, isoladas principalmente de bactérias, fungos e plantas são polissacarídeos bastante estudados quanto às atividades imunológicas e antitumorais, sendo inclusive descrita a presença de um receptor específico em macrófagos de camundongos que se liga a  $\beta$ -glucanas e gera respostas em termos de secreção de interleucinas, NO,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e aumento da capacidade fagocítica (GOLDMAN, 1988; ABEL e CZOP, 1992; SAKURAI *et al.*, 1992; STONE e CLARKE, 1992; ADACHI *et al.*, 1993; BOHN e BEMILLER, 1995; WAKSHULL *et al.*, 1999).

Os efeitos das galactomananas e mananas também já foram estudados, e foram observadas alterações na produção de NO e capacidade fagocítica (PIERARD

*et al.*, 1991; INGOLFSDOTTIR *et al.*, 1994; RAMESH *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2002, 2004).

Além das mananas e glucanas, sabe-se também que polissacarídeos pécticos e arabinogalactanas são ativadores de macrófagos, além de já terem sido relatadas propriedades ativadoras anticomplemento e hematopoiéticas (SCHEPETKIN e QUINN, 2006). Estudos já mostraram que ocorre estímulo *in vitro* da via alternativa do sistema complemento humano quando em contato com uma arabinogalactana (WAGNER e JORDAN, 1998; DIALLO *et al.*, 2003; KARDOSOVÁ *et al.*, 2004).

No estudo realizado por Inngjerdingen e colaboradores (2005), foram isolados e caracterizados dois polissacarídeos (arabinogalactana e ramnogalacturonana do tipo II) a partir da planta medicinal *Glinus oppositifolius*. Ambos apresentaram atividade fixadora do complemento em uma relação dose-dependente e foram capazes de induzir a quimiotaxia de macrófagos, células T e NK. Um estudo semelhante envolvendo AG e pectinas foi realizado por Nergard e colaboradores (2005), no qual os autores isolaram e demonstraram atividade de polissacarídeos de *Vernonia kotschyana*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL DE ESTUDO

Nesse estudo foram utilizados vinhos Cabernet Sauvignon (vinho tinto, reserva, Concha y Toro, Chile), Sauvignon Blanc (vinho branco, reserva, Concha y Toro, Chile) e Cabernet Franc (vinho tinto, reserva, Salton, Brasil). Todos os vinhos utilizados foram produzidos com variedades de uvas da espécie *Vitis vinífera*.

### 4.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

#### 4.2.1. Obtenção de polissacarídeos por precipitação etanólica

750 mL de cada vinho citado acima foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida em banho-maria em temperatura média de 50 °C. Em seguida, os polissacarídeos foram precipitados em etanol (3 volumes) a 4 °C por 18 horas para obtenção dos polissacarídeos. Após precipitação, as amostras foram centrifugadas na velocidade de 8.000 rpm, dialisadas contra H<sub>2</sub>O destilada em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa e liofilizadas.

### 4.3. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

#### 4.3.1. Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo

Os extratos dos vinhos contendo polissacarídeos foram submetidos a congelamento e posterior descongelamento à temperatura ambiente. O precipitado, insolúvel em água fria, foi separado do sobrenadante por centrifugação (9.000 rpm/

15 min a 5 °C). Esse processo foi repetido até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado após congelamento e descongelamento (GORIN; IACOMINI, 1984). Após essas etapas, as frações solúveis (sobrenadante de congelamento e degelo) e insolúveis em água fria (precipitado de congelamento e degelo) foram concentradas e liofilizadas. As frações solúveis foram chamadas de ACS (Cabernet Sauvignon), ASB (Sauvignon Blanc) e ACF (Cabernet Franc).

#### 4.3.2. Fracionamento dos polissacarídeos pelo método de Fehling

As frações solúveis foram submetidas ao fracionamento pelo método de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965). Foram solubilizadas diretamente na solução B de Fehling (KOH + tartarato de sódio e potássio) e a estas se adicionou igual volume da solução A de Fehling (sulfato de cobre). Em seguida, o material ficou sob agitação mecânica e foi mantido por 12 h em refrigeração. O precipitado obtido foi separado do sobrenadante por centrifugação (10.000 rpm / 15 min a 25 °C). Tanto o precipitado quanto o sobrenadante foram neutralizados com ácido acético, dialisados, agitados em suspensão aquosa de resina catiônica fortemente ácida para eliminar o cobre residual, e novamente dialisados. As frações obtidas (sobrenadante e precipitado de Fehling) foram concentradas e liofilizadas. As frações obtidas a partir do sobrenadante foram chamadas de FCF (Cabernet Franc), FCS (Cabernet Sauvignon) e FSB (Sauvignon Blanc) e as frações originadas do precipitado foram chamadas de PCF (Cabernet Franc), PCS (Cabernet Sauvignon) e PSB (Sauvignon Blanc).

#### 4.3.3. Fracionamento dos polissacarídeos por coluna de troca iônica

As frações obtidas a partir do sobrenadante de Fehling (200 mg de cada fração) foram submetidas ao fracionamento através de coluna de troca iônica contendo resina cromatográfica DEAE-Sepharose *Fast Flow* com velocidade de fluxo entre 300 e 600 cm/h. As amostras foram eluídas em solução de NaCl 0 M, 0,1

M, 0,2 M, 0,3 M e 0,5 M e coletado em média 500 mL para cada fração obtida. Em seguida, todas as frações obtidas foram dialisadas em membrana com limite de exclusão 6-8 kDa e liofilizadas.

#### 4.4. ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

##### 4.4.1. Composição monossacarídica

As composições monossacarídicas foram determinadas após a hidrólise de aproximadamente 2 mg dos polissacarídeos com 1 mL de TFA (Ácido trifluoroacético) 1 mol/L, a 100 °C em estufa por 14 h. As soluções foram evaporadas e o resíduo dissolvido em 2 mL de água destilada, sendo que uma pequena fração foi analisada por Cromatografia de Camada Delgada (TLC) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), e ao restante do material foram adicionados 2 mg NaBH<sub>4</sub>. Após 18 h, foi adicionado ácido acético, as soluções foram evaporadas até secar e o ácido bórico resultante removido como borato de trimetila por repetidas evaporações com metanol (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v; 2 mL), à temperatura ambiente, *overnight*. As reações de acetilação foram interrompidas com gelo e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio, o qual foi lavado diversas vezes com solução aquosa de CuSO<sub>4</sub> a 5% para a eliminação da piridina residual. A fase clorofórmica foi, então, desidratada com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro, filtrada e evaporada à temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons. A quantificação relativa dos monossacarídeos feita através do RMN-HSQC foi determinada pela integração das correlações de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C anoméricos e normalizados para valores de percentual (SASSAKI, 2014).

#### 4.4.2. Metilação dos polissacarídeos isolados e análise na forma de acetatos de alditóis

Os polissacarídeos foram metilados pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). O polissacarídeo foi solubilizado em Me<sub>2</sub>SO (1 mL). Excesso de NaOH triturado e seco foi adicionado à solução, seguido pela adição de CH<sub>3</sub>I (1 mL), agitação em vórtex por 30 min e repouso por 24 h. A metilação foi interrompida com água destilada sob banho de gelo e a solução acidificada com ácido acético ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água destilada. A fase clorofórmica foi evaporada e o material hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% (v/v; 0,5 mL) por 1 h a 0 °C, seguido pela diluição a 5,5% (v/v; adição de 4,0 mL de água destilada) e aquecimento a 100 °C por 17 h (SAEMAN *et al.*, 1954). O material hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi neutralizado com BaCO<sub>3</sub>, filtrado, reduzido com NaBD<sub>4</sub> e acetilado. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976; SASSAKI *et al.*, 2005).

#### 4.4.3. Carboxirredução

O processo de carboxirredução foi realizado segundo Taylor e Conrad (1972), que consiste na reação de ácidos carboxílicos com carbodiimidas, gerando ésteres que podem ser reduzidos na presença de NaBH<sub>4</sub>. Nesse caso, as unidades de ácidos urônicos de um polissacarídeo são convertidas no seu açúcar neutro correspondente. O polissacarídeo foi dissolvido em tampão MES [ácido 2-(N-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 mol/L, pH 4,75, 10 mL) e a este foram adicionados, pouco a pouco e sob agitação, 24 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida] para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A mistura de reação permaneceu sob agitação por 2 h. Em seguida, foi adicionado tampão TRIS (2 mol/L, pH 7,0) até pH 7,0 (5 mL) e, posteriormente, NaBH<sub>4</sub> ou NaBD<sub>4</sub> para uma

concentração final de 2 mol/L (1,13 g). Durante a adição do  $\text{NaBH}_4$  ou  $\text{NaBD}_4$ , o pH do meio foi controlado em 7,0 pela adição de HCl diluído e, a formação de espuma foi evitada pela adição de algumas gotas de octanol. Após 14 h, a redução foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5,0. O material foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa, concentrado e liofilizado.

#### 4.5. TESTE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR

Os ensaios de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizados no aparelho da *Wyatt Technology*, equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC), com quatro colunas de gel permeação em série, com limites de exclusão de  $7 \cdot 10^6$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^4$  e  $5 \cdot 10^3$  Da, um detector de índice de refração modelo Waters 2410, e um detector de espalhamento de laser multiângulos (MALLS) a 632,8 nm modelo Dawn DSP, que promove a leitura do espalhamento de luz, que é captado em diferentes intensidades por detectores em diferentes ângulos. Como eluente, foi usada uma solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 mol/L contendo  $\text{NaN}_3$  0,2 g/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min. As amostras foram solubilizadas na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL, e filtradas através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Uma quantidade de 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi injetada e os resultados foram obtidos com o software ASTRA 4.70.07.

A obtenção da massa molar foi realizada após a obtenção da taxa de variação do índice de refração com relação à concentração ( $dn/dc$ ) do polissacarídeo purificado, uma vez que essa é uma característica específica de cada molécula. A amostra foi solubilizada na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL, e filtrada através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,45  $\mu\text{m}$ . A amostra foi diluída para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL e analisada utilizando-se apenas o detector de índice de refração, com as colunas desacopladas. O fluxo do solvente

foi de 0,1 mL/min, uma quantidade de 200 µL de amostra foi injetada no equipamento e os resultados foram obtidos com o software ASTRA 4.70.07.

## 4.6. MÉTODOS ANÁLITICOS

### 4.6.1. Método cromatográfico

#### 4.6.1.1. Cromatografia em camada delgada (inglês: Thin layer chromatography, TLC)

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para verificar a composição monossacarídica e a presença de ácidos urônicos dos polissacarídeos hidrolisados presentes nas frações obtidas a partir do precipitado etanólico da extração aquosa.

As análises foram realizadas em placas de sílica gel 60G (MERCK) com 8 cm de altura total. Para a análise de carboidratos a fase móvel utilizada foi uma mistura de acetato de etila:ácido acético:*n*-propanol:água (4:2:2:1, v/v) e o revelador utilizado foi orcinol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 g de orcinol, em 95 mL de etanol e 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (SASSAKI *et al.*, 2008).

#### 4.6.1.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa foi realizada em cromatógrafo Varian Saturn 2000R - 3800 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 2000R ou 4000R, utilizando a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 mL/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis foram analisados a uma temperatura de 50 - 220 °C (40 °C/min) e os acetatos de alditóis parcialmente metilados a uma temperatura de 50 - 215 °C (40 °C/min).

## 4.6.2. Método Espectroscópico

### 4.6.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN 1D e 2D foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance-III 600 MHz e Avance HD 400 MHz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram analisadas em uma sonda inversa de 5 mm de diâmetro interno, nas temperaturas de 30 °C. Os polissacarídeos foram solubilizados em D<sub>2</sub>O. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm utilizando trimetil silil propionato de sódio deuterado (TMSP-2,2,3,3-d<sub>4</sub>) como referência interna  $\delta$  (<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H= 0 ppm).

### 4.6.3. Métodos Espectrofotométricos

#### 4.6.3.1. Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada segundo Filisetti-cozzi e Carpita (1991). Foi utilizado 0,4 mL de amostra (sensibilidade de 2-38,8 µg de ácido urônico em 0,4 mL), sobre a qual foram adicionadas 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 mol/L (pH 1,6). Em seguida, foram adicionados 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mmol/L em ácido sulfúrico). A solução foi agitada em vórtex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após resfriar os tubos até a temperatura ambiente (em banho de gelo), adicionaram-se 80 µL de meta-hidroxibifenila (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v) e agitou-se novamente em vórtex. A presença de ácidos urônicos é visualizada pelo aparecimento de uma coloração rósea. A sensibilidade do método é de 0,97-38,8 µg de ácido urônico (em 0,4 mL de amostra), com leitura em 525 nm, utilizando o ácido galacturônico como padrão.

#### 4.6.3.2. Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) e pelo método de Biureto (GORNALL *et al.*,1949). No método de Bradford é utilizado o reagente de Bradford contém como seu principal componente o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* em solução ácida, este ao ligar-se às proteínas, tem a sua absorvância alterada de 465 nm para 595 nm. Essa interação entre o corante *Coomassie* e a proteína, estabiliza a forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanho para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. Foram utilizadas 100 µL de cada amostra e adicionado 5 mL do reagente de Bradford. As soluções foram agitadas e mantidas por no mínimo 5 min à temperatura ambiente. A presença de proteínas foi visualizada pelo aparecimento de uma coloração arroxeada e leitura a 590 nm. Soroalbumina bovina foi utilizada como padrão.

A dosagem de proteínas totais também foi feita através do método de Biureto (GORNALL *et al.*,1949). O método se baseia na reação do reativo do Biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução. O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto de reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm. Foram utilizadas 5 mL de cada amostra em diferentes concentrações e adicionado o reativo de Biureto. As soluções foram agitadas e mantidas por 10 min à temperatura ambiente e a leitura feita a 540 nm. Soroalbumina bovina foi utilizada como padrão.

### 4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS POLISSACARÍDEOS *IN VITRO*

#### 4.7.1. Cultivo celular

A linhagem celular utilizada no trabalho foi a RAW-Blue™(InvivoGen), células derivadas de macrófagos RAW 264.7 que expressam todos os receptores toll-like (TLRs), com exceção do TLR5. Essa linhagem foi cultivada em meio de cultura líquido DMEM (Sigma-Aldrich), com 50 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich), 50 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich), 100 mg/mL de Normocina™(InvivoGen), e soro fetal bovino (FBS-Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante (InvivoGen).

#### 4.7.2. Determinação da atividade celular (MTT)

Para que o teste (item 4.7.3.) na linhagem celular fosse realizado, primeiramente foram avaliadas as atividades celulares pelo método de MTT (MOSMANN, 1983 adaptado por NASCIMENTO 2009).

O método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) baseia-se na atividade das redutases mitocondriais, as quais reduzem o anel tetrazólio do MTT a cristais roxos de formazan nas mitocôndrias das células vivas. A solubilização dos cristais, pelo DMSO (dimetilsulfoxido), gera uma solução colorida que pode ser quantificada. O aumento da intensidade da cor é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Para tanto, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $0,3 \times 10^5$  células/poço para RAW-Blue) em um volume de 190  $\mu$ L/poço. As células RAW-Blue foram mantidas 24 h na incubadora a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> para adesão. Os tratamentos (ACF, ACS e ASB nas concentrações de 2, 20, 200  $\mu$ g/mL) e controle (água miliQ estéril – Sigma-Aldrich) foram adicionados (10  $\mu$ L/poço) e as placas mantidas na incubadora durante os tempos de 24 e 48 h. 3 h antes do término do tratamento foram adicionados, em todos os poços, 20  $\mu$ L/poço da solução de MTT 5 mg/mL. Ao final do tratamento, foi adicionado DMSO (50  $\mu$ L) em todos os poços para lisar as células e solubilizar os cristais. A placa foi mantida em agitador mecânico por 12 h para solubilização completa dos cristais e a leitura foi realizada em leitor de microplacas, na função escaneamento, em 595 nm.

#### 4.7.3. Determinação da ativação das vias de NF- $\kappa$ B e AP-1

A linhagem celular RAW-Blue™ expressa estavelmente o gene da fosfatase alcalina embrionária secretável (SEAP), o qual é induzido pelos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1. A estimulação com um ligante nos receptores TLR, por exemplo, ativa NF- $\kappa$ B e AP-1, que induzem a produção de SEAP. Níveis de SEAP são determinados pelo ensaio QUANTI-Blue™ (InvivoGen), o qual é um método enzimático colorimétrico desenvolvido para determinar qualquer atividade de fosfatase alcalina em uma amostra biológica, assim como em sobrenadantes de culturas celulares. O meio com QUANTI-Blue™ muda para roxo-azulado na presença de SEAP sendo lido em 620 nm.

Os experimentos, portanto, basearam-se em expor a linhagem celular às frações em estudo (ACF, ACS e ASB) na concentração de 100  $\mu$ g/mL, na presença de lipopolissacarídeos (LPS) nos poços. A detecção colorimétrica da proteína SEAP expressa indica, indiretamente, se as substâncias testadas ativam ou não as vias de NF- $\kappa$ B e/ou AP-1.

Para tanto, as células RAW-Blue foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  célula/poço; volume final de 170  $\mu$ L/poço) com meio DMEM acrescido dos antibióticos e SFB inativado. Foi adicionado LPS (100  $\mu$ g/mL - 20  $\mu$ L/poço) em todos os poços, com exceção do controle negativo que havia apenas água miliQ estéril. Após 30 min, foram adicionados os tratamentos (ACF, ACS e ASB - 10  $\mu$ L/poço) e controles (água miliQ estéril - 20  $\mu$ L/poço). As placas foram mantidas durante 24 h na incubadora a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Ao término do tempo de tratamento, 50  $\mu$ L do meio de cultura foi coletado e transferido para outra placa de 96 poços, na qual também foi adicionado 150  $\mu$ L/poço do reagente QUANTI-Blue. A placa foi mantida por 3 h na incubadora e então foi realizada leitura em leitor de microplacas em comprimento de onda de 620 nm.

#### 4.7.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A avaliação estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Em todas as análises, valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os gráficos e as análises estatísticas foram obtidos com o auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

Os polissacarídeos foram obtidos a partir dos vinhos Cabernet Franc (CF), Cabernet Sauvignon (CS) e Sauvignon Blanc (SB) através de precipitação etanólica. As etapas de extração e purificação dos polissacarídeos são mostradas resumidamente na figura 8.

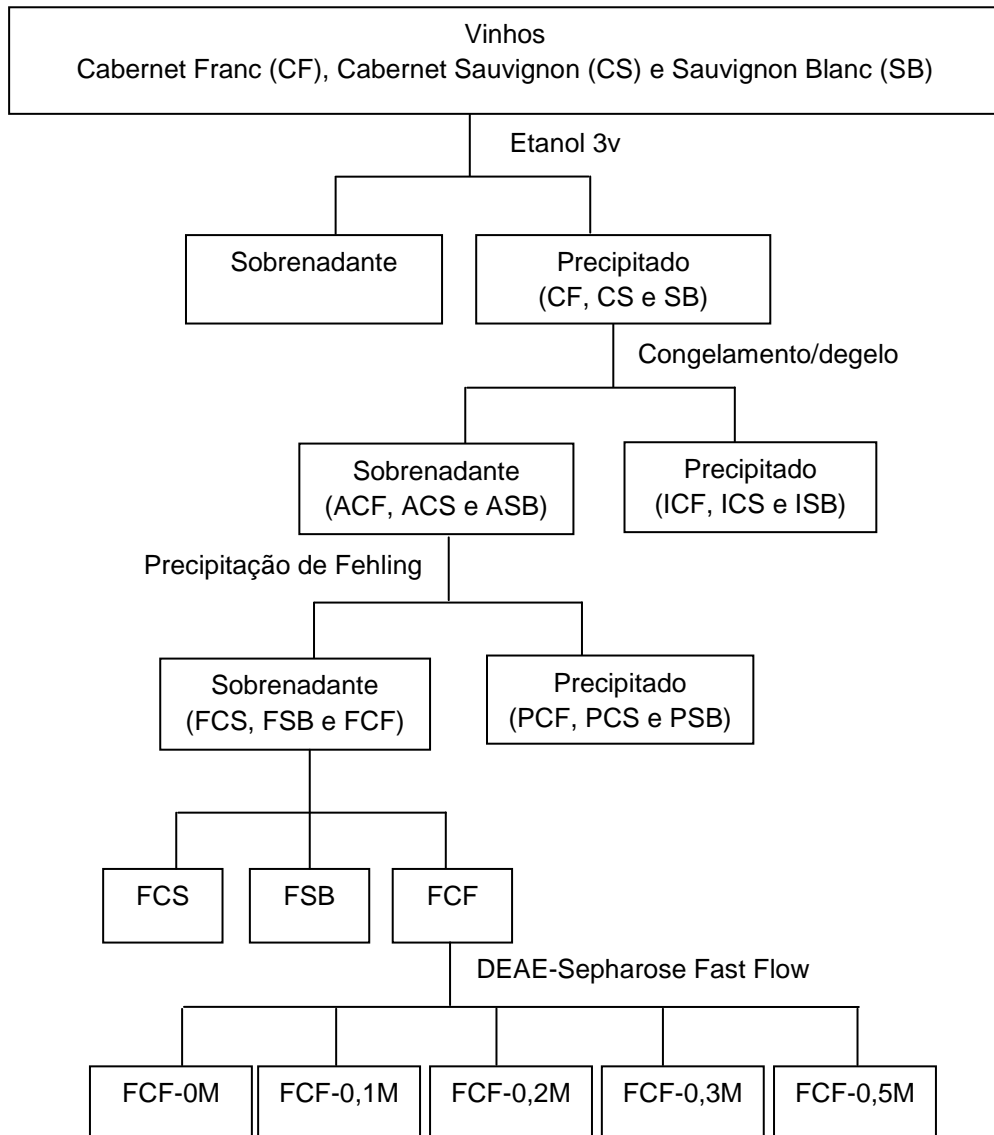


FIGURA 8: Fluxograma do processo de extração e fracionamento dos polissacarídeos obtidos a partir dos vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc. A- frações solúveis; I- frações insolúveis; P- frações do precipitado de Fehling e F- frações do sobrenadante de Fehling.

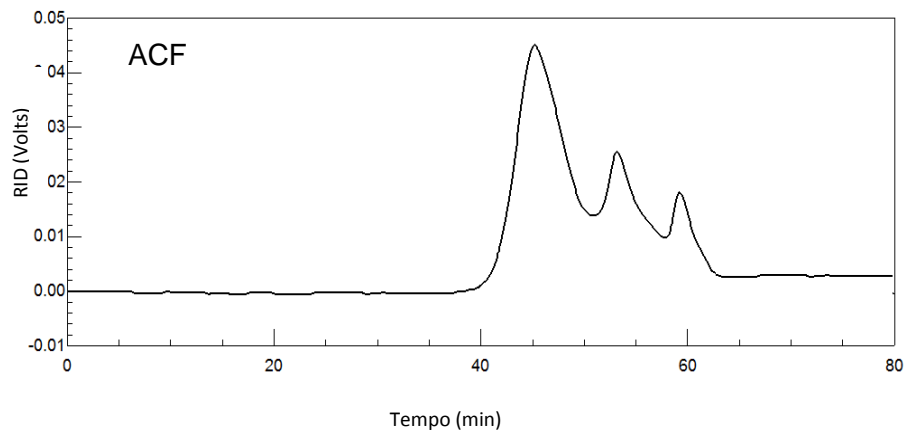
Após tratamento com etanol, os componentes de alta massa molar foram separados dos de baixa massa molar. Os precipitados obtidos com tratamento com etanol apresentaram rendimentos de: 0,16% (CF), 0,05% (CS) e 0,02% (SB) que continham os polissacarídeos. Essas frações foram avaliadas quanto à presença de proteínas totais e apresentaram porcentagem de 0,9%/0,4% (CF), 0,8%/0,2% (CS), e 0,4%/0,1% (SB) pelos métodos de Bradford/Biureto. Todas as frações apresentaram teor de <1% de proteínas, mostrando um baixo teor de proteínas nas frações polissacarídicas. As frações foram, então, submetidas ao processo de fracionamento por congelamento e degelo, rendendo uma fração solúvel (ACF, ACS e ASB) e insolúvel (ICF, ICS e ISB) para cada vinho.

As frações ACF, ACS e ASB que contém os polissacarídeos solúveis em água fria foram analisadas por RMN-<sup>13</sup>C e HSQC, HPSEC-MALLS e GC-MS. A análise da composição monossacarídica apresentou Ara, Gal, Glc, Rha, Man e GalA como principais açúcares para as três frações, mas com concentrações distintas (tabela 1) e apresentaram perfil heterogêneo quando analisadas por HPSEC-MALLS (figura 9).

TABELA 1: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ACF, ACS e ASB

Frações	%	Método	Monossacarídeos (%)							
			Gal	Ara	Rha	Man	Glc	Xyl <sup>1</sup>	Fuc <sup>2</sup>	GalA
ACF	0,16	GC/MS	39,7	12,1	9,2	20,2	10,1	0,4	0,3	8,0*
		RMN	38,0	14,5	9,3	16,3	11,1	0	0	9,0
ACS	0,05	GC/MS	34,2	14,1	8	28,5	7,7	0,3	0,1	7,1*
		RMN	32,6	15,0	9,3	26,3	8,8	0	0	8,0
ASB	0,02	GC/MS	24,5	16,2	4,2	42,4	6,6	0,1	0,1	6,0*
		RMN	28,1	14,2	4,6	40,2	7,8	0	0	5,1

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS e RMN. (1) A xilose encontrada refere-se a 2-O-metil-xilose. (2) A Fucose, refere-se a 2-O-metil-fucose. (\*) Determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Gal (galactose); Ara (arabinose); Rha (ramnose); Man (manose); Glc (glucose); Xyl (xilose); Fuc (fucose); GalA (ácido galacturônico).



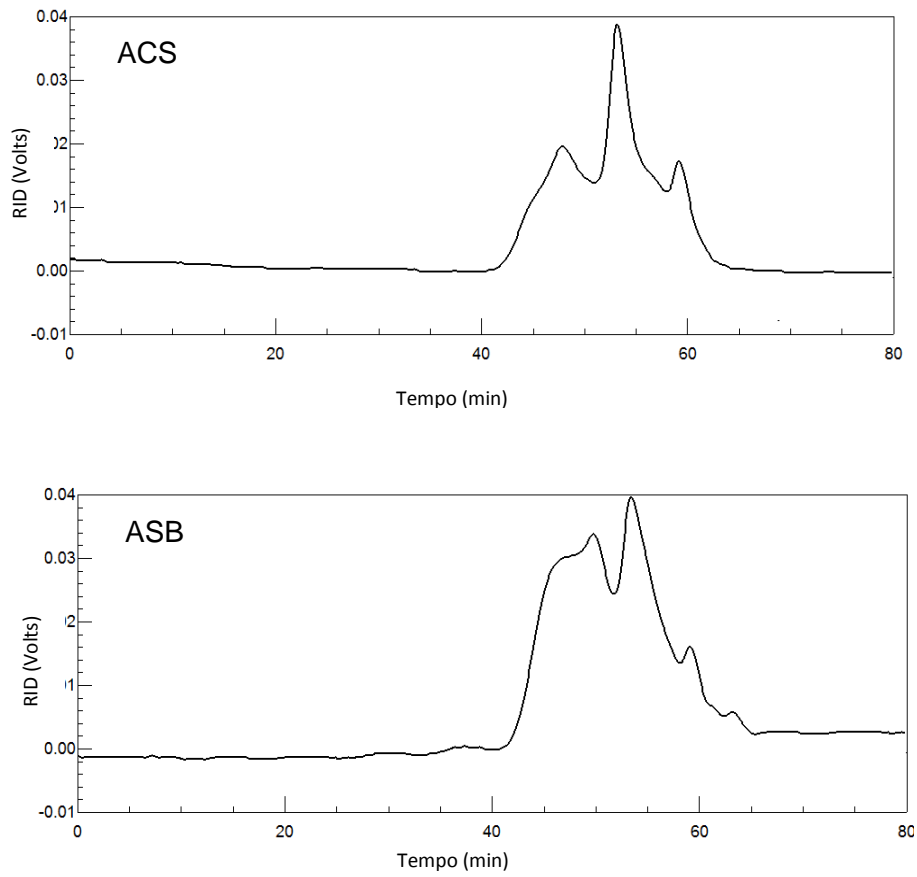
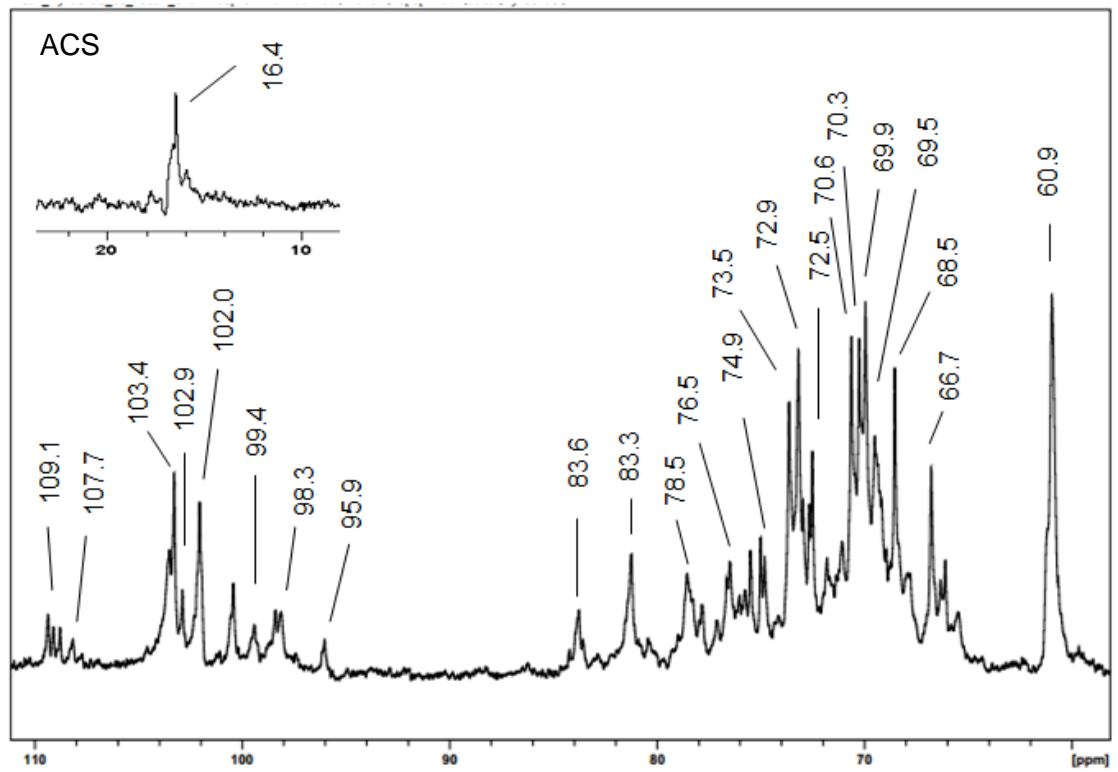
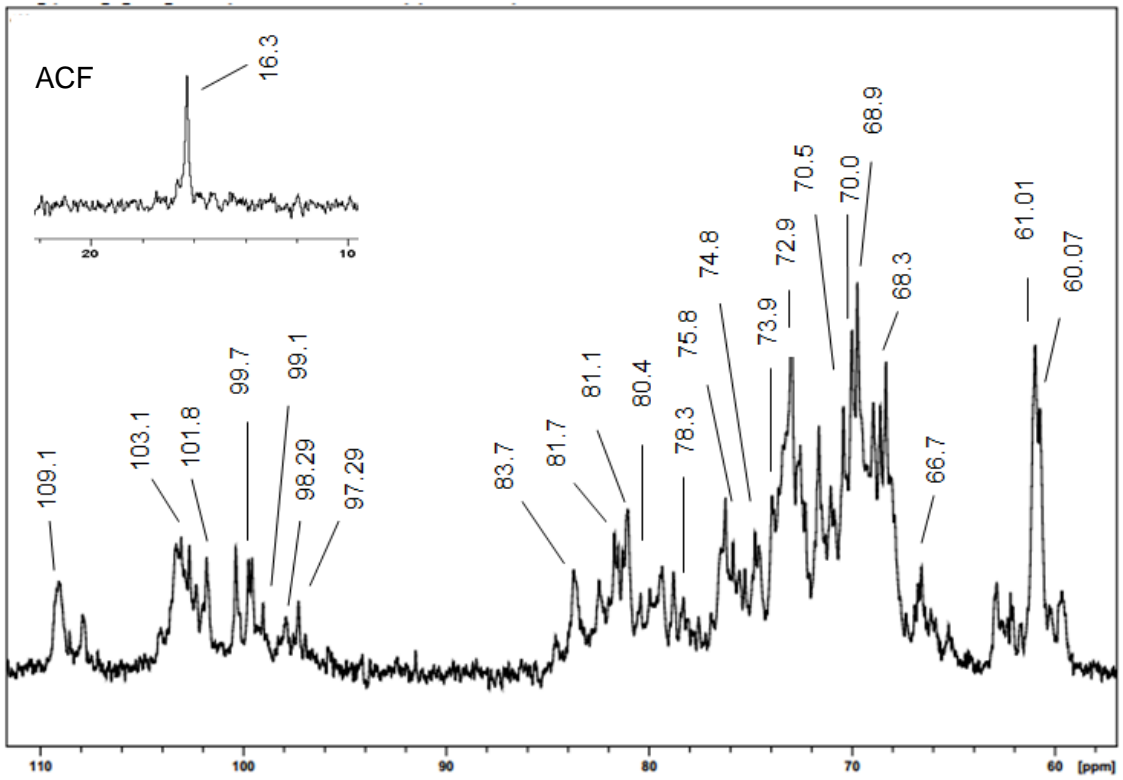


FIGURA 9: Perfis de eluição em HPSEC-MALLS, utilizando detector de índice de refração (RID), das frações ACF, ACS e ASB.

A análise de RMN-<sup>13</sup>C das frações ACF, ACS e ASB apresentaram sinais característicos de polissacarídeos (figura 10). Esses sinais são visualizados entre 96 – 110 ppm para a região anomérica e 59 – 85 ppm e 16 – 20 ppm para os demais carbonos. Os espectros de todas as frações apresentaram sobreposição de sinais na região entre 59 – 85 ppm, devido a mistura de polissacarídeos presente em todas as frações, como mostrado no perfil heterogêneo das amostras analisadas por HPSEC-MALLS (figura 9) .



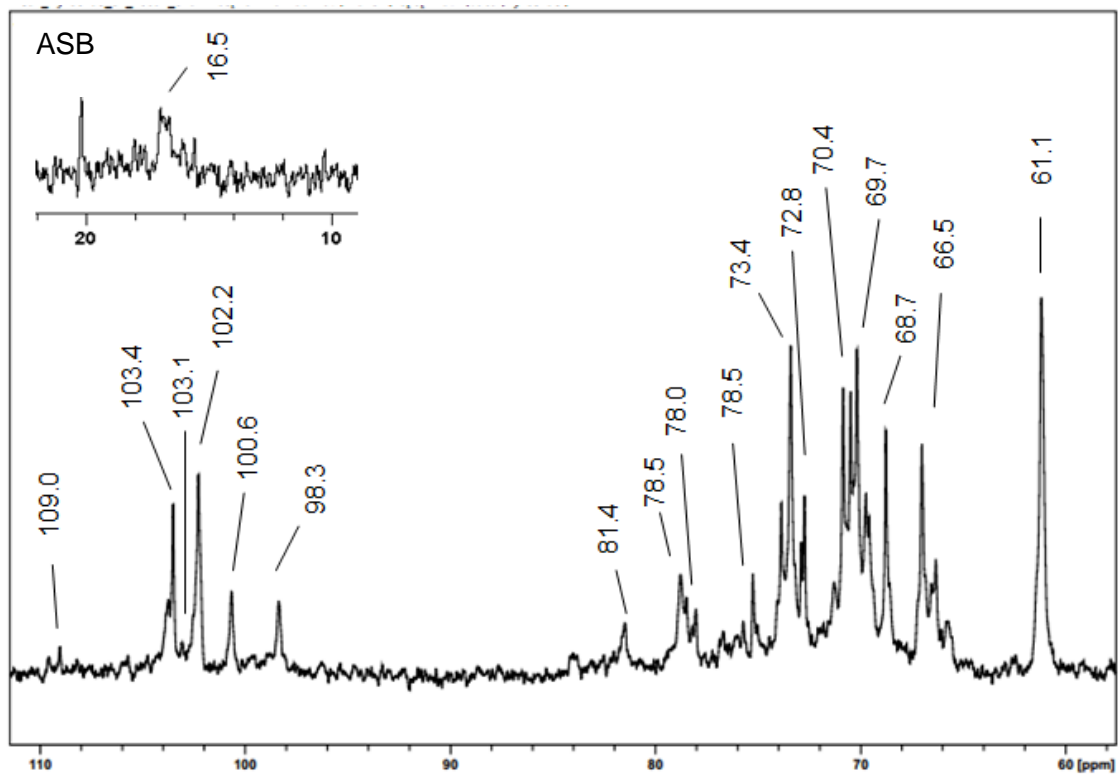


FIGURA 10: Espectros de RMN-<sup>13</sup>C das frações ACF, ACS e ASB em D<sub>2</sub>O, a 30 °C, com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm.

A caracterização do ácido urônico presente nas frações ACF, ACS e ASB foi realizada por TLC utilizando os padrões de GalA e GlcA como referências (figura 11), por RMN-HSQC e por carboxirredução seguida de análise por GC-MS. Na análise por TLC foi observada apenas a presença de GalA nas frações, o que também foi visto pelo espectro de RMN-HSQC, já que não foram encontrados sinais de GlcA (figura 17). Além disso, também foi feita carboxirredução das frações e houve aumento correspondente das unidades de galactose quando analisadas por GC-MS, comprovando que nas três frações havia apenas GalA.

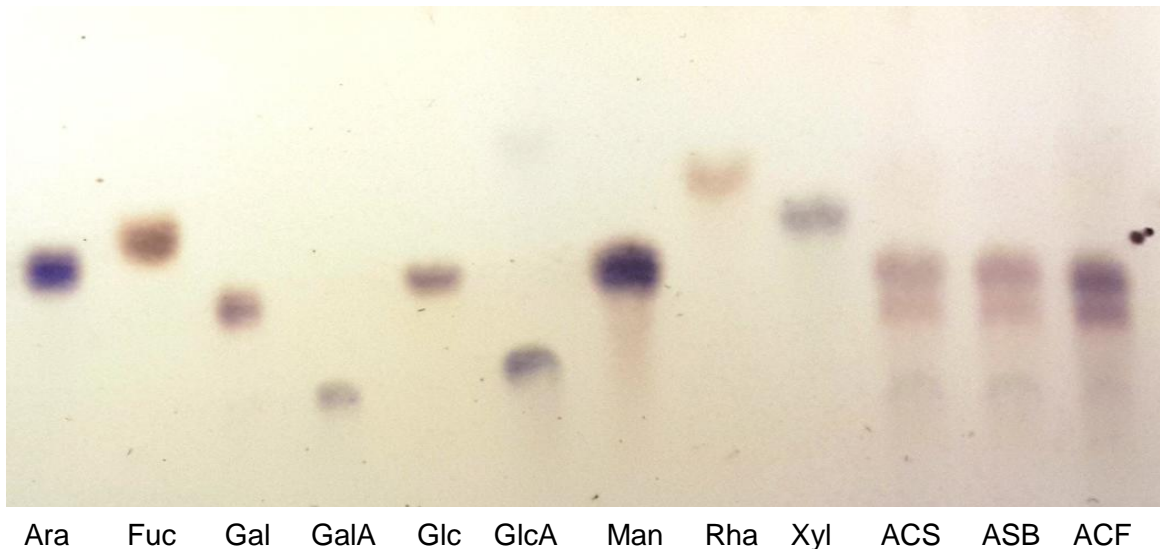


FIGURA 11: TLC das frações ACF, ACS e ASB. Fase móvel: acetato de etila:ácido acético:*n*-propanol:água (4:2:2:1, v/v); revelador: orcinol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 g de orcinol, em 95 mL de etanol e 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (SASSAKI et al., 2008).

As frações solúveis em água foram tratadas com solução de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965). A partir desse tratamento, foram obtidas duas novas frações para cada vinho: sobrenadante (FCF, FCS e FSB) e precipitado (PCF, PCS e PSB). As frações obtidas através do precipitado de Fehling apresentaram majoritariamente unidades de manose em sua composição monossacarídica, sugerindo a presença de mananas (tabela 2). Como todas as frações apresentam o mesmo perfil e, RMN-HSQC e composição monossacarídica semelhante, a fração PSB foi escolhida para caracterização estrutural da manana, por ter apresentado maior rendimento. As frações FCF, FCS e FSB apresentaram em sua composição monossacarídica unidades de Ara, Gal, Glc, Rha, Man e GalA e perfil semelhante por RMN-HSQC, indicando que provavelmente elas possuem os mesmos polissacarídeos (tabela 2). Então, a fração do sobrenadante do método de Fehling com maior rendimento (FCF) foi aplicada em uma coluna de troca iônica com resina DEAE-Sepharose *Fast Flow* e eluída com NaCl 0M, 0,1M, 0,2M, 0,3M e 0,5M a fim de caracterizar os outros polissacarídeos contidos nos vinhos.

TABELA 2: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO MÉTODO DE FEHLING

Frações	Monossacarídeos (%)					
	Man	Ara	Rha	Gal	Glc	GalA*
PCF	81,1	1,3	1,7	14,8	-	1,2
PCS	87,8	1,1	1,3	8,4	-	1,4
PSB	90,1	1,7	1,2	3,7	-	1,3
FCF	5,3	21,0	3,9	47,8	18,9	3,1
FCS	17,0	10,1	9,8	34,4	20,5	8,2
FSB	16,3	13,8	4,7	43,9	16,1	5,3

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS; (\*) determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

Após o fracionamento realizado por meio de cromatografia de troca iônica foram obtidas cinco frações (FCF-0M, FCF-0,1M, FCF-0,2M, FCF-0,3M e FCF-0,5M). Análises em HPSEC-MALLS mostraram que todas as frações apresentaram perfil heterogêneo de eluição (figura 12). De acordo com a análise monossacarídica (tabela 3), apenas as frações FCF-0M e FCF-0,1M apresentaram unidades de manose, sugerindo que o componente residual de manana, provavelmente, foi separado nas primeiras eluições. Como também, foi observada a presença de glucose somente nas três primeiras frações (FCF-0M, FCF-0,1M e FCF-0,2M), o que pode estar relacionada à presença de dextrina. Como foi notado que houve redução dos conteúdos de glucose nas eluições seguidas, sugere-se que estas unidades, provavelmente, fazem parte da dextrina, o que foi mostrado também pelo

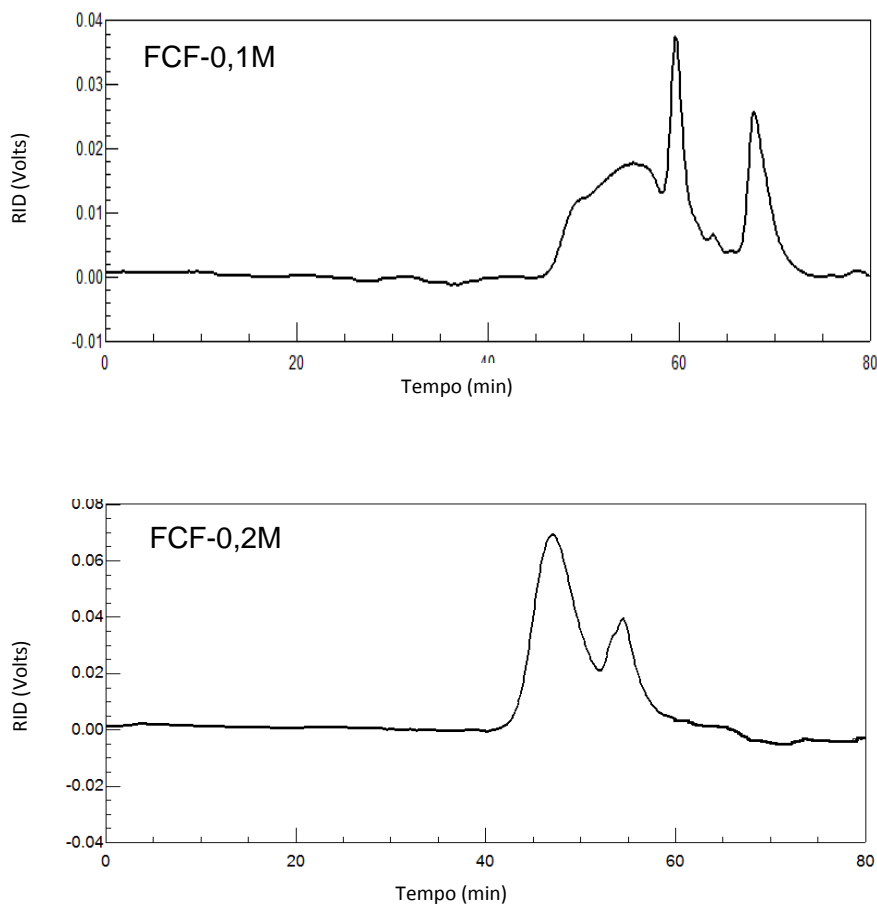
deslocamento químico apresentado no espectro de RMN-HSQC (figura 13). Além disso, todas as frações apresentaram Rha, Ara, Gal e GalA. No entanto, foi observado que as frações FCF-0,3M e FCF-0,5M continham apenas essas unidades monossacarídicas em sua composição, indicando a provável presença de uma arabinogalactana e uma ramnogalacturonana, os quais são polissacarídeos estruturais presentes na maioria dos vegetais superiores (FINCHER *et al.*, 1983) e podem ser originados das bagas das uvas. A presença desses polissacarídeos também foi observada pelos espectros de RMN-HSQC das frações, os quais estão representados na figura 13, mostrando a região anomérica com sinais típicos dos monossacarídeos encontrados nos polissacarídeos mencionados acima.

TABELA 3: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO FRACIONAMENTO OBTIDO A PARTIR DA FRAÇÃO FCF

Frações	Rendimento (%)	Monossacarídeos (%)					
		Rha	Ara	Man	Glc	Gal	GalA*
FCF-0M	9,0	2,9	16,4	14,8	20,8	41,5	3,6
FCF-0,1M	12,4	3,6	15,0	17,5	26,0	33,4	4,5
FCF-0,2M	23,8	5,1	25,2	-	18,5	47,7	3,5
FCF-0,3M	52,5	5,5	21,1	-	-	67,3	6,1
FCF-0,5M	2,3	4,8	27,7	-	-	64,2	3,3

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS; (\*) determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

Ainda analisando a tabela 3, pode-se notar que Ara e Gal são os principais monossacarídeos presentes em todas as frações, sugerindo que a arabinogalactana é o principal tipo de polissacarídeo encontrado nos vinhos estudados. A alta similaridade dos sinais dos carbonos anoméricos nas análises de RMN-HSQC das frações ACF-0,3M e ACF-0,5M (figura 13) sugere que elas são formadas pelos mesmos polissacarídeos e, provavelmente, diferem apenas em relação à massa molar e à concentração. Por isso, a fração FCF-0,3M, que obteve maior rendimento no fracionamento e apresentou em sua composição monossacarídica apenas Rha, GalA, Ara e Gal, foi escolhida para caracterização estrutural dos polissacarídeos (arabinogalactana e ramnogalacturonana).



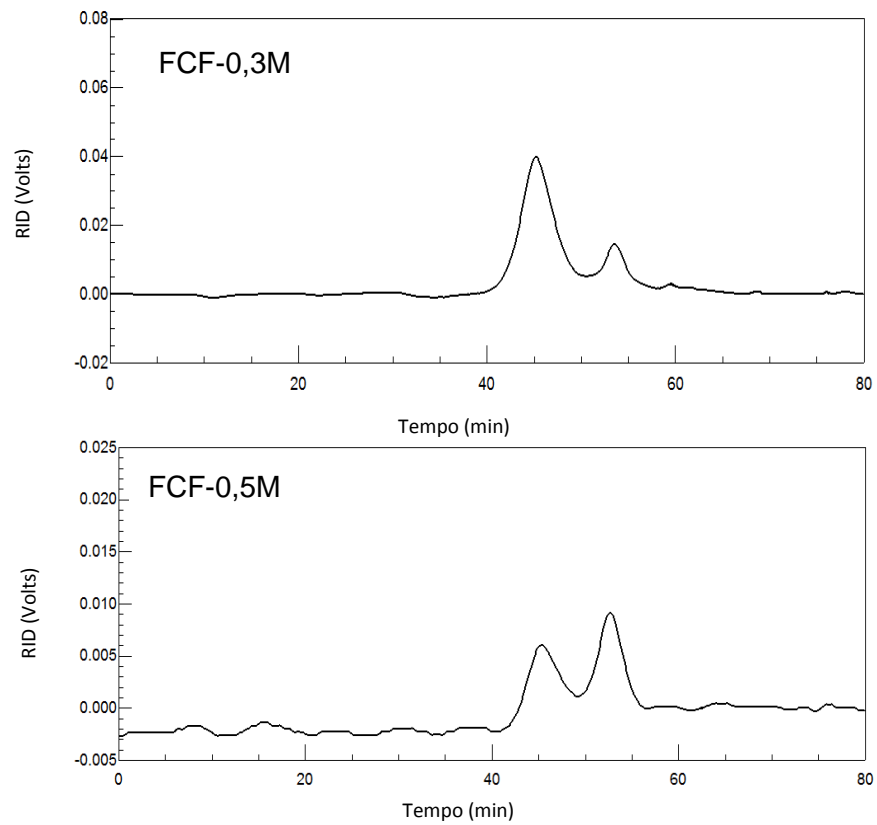
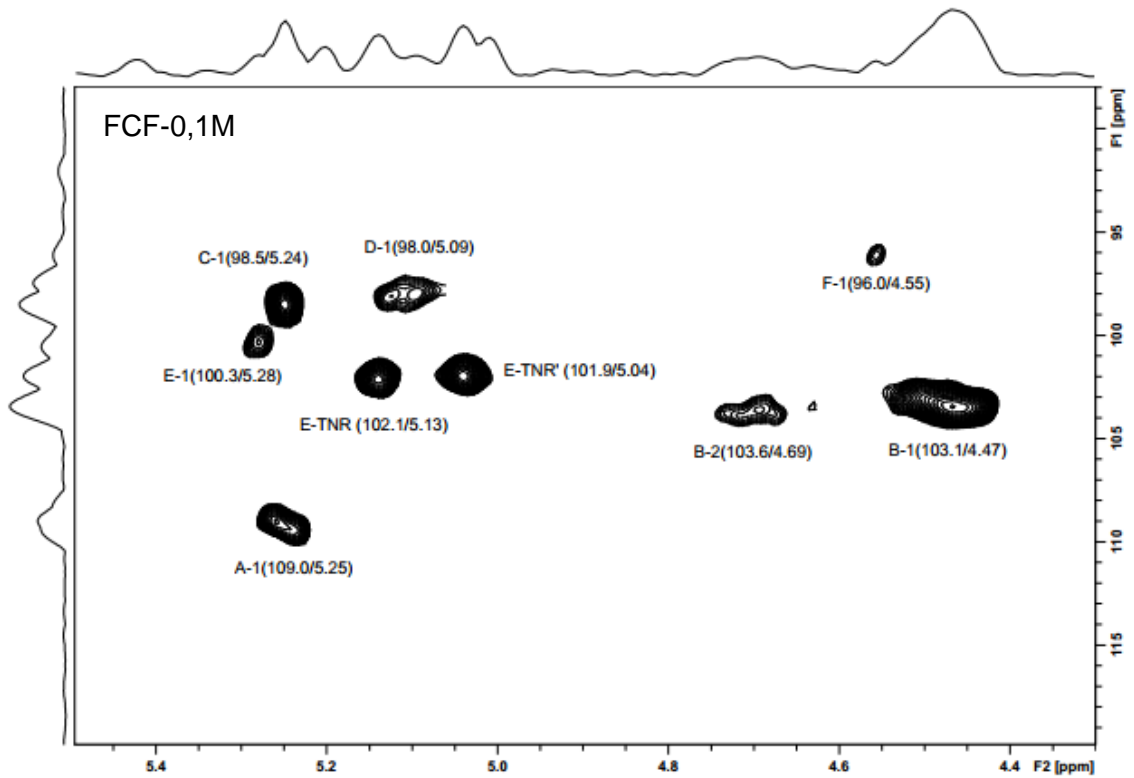
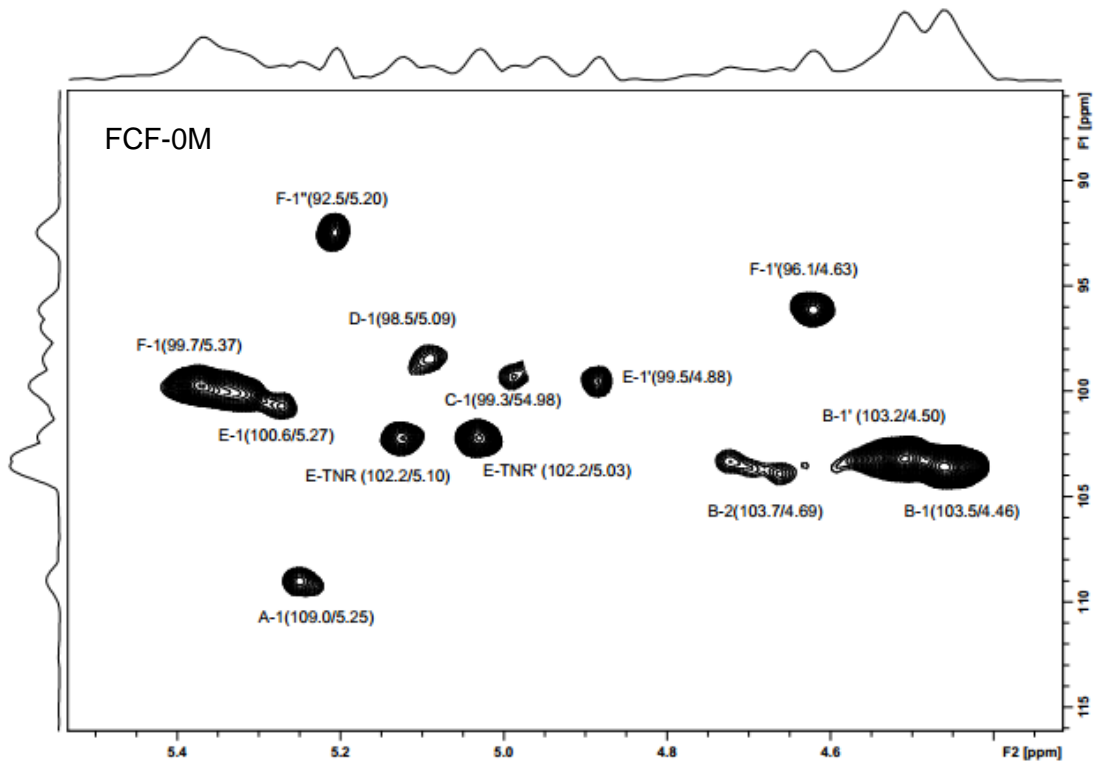
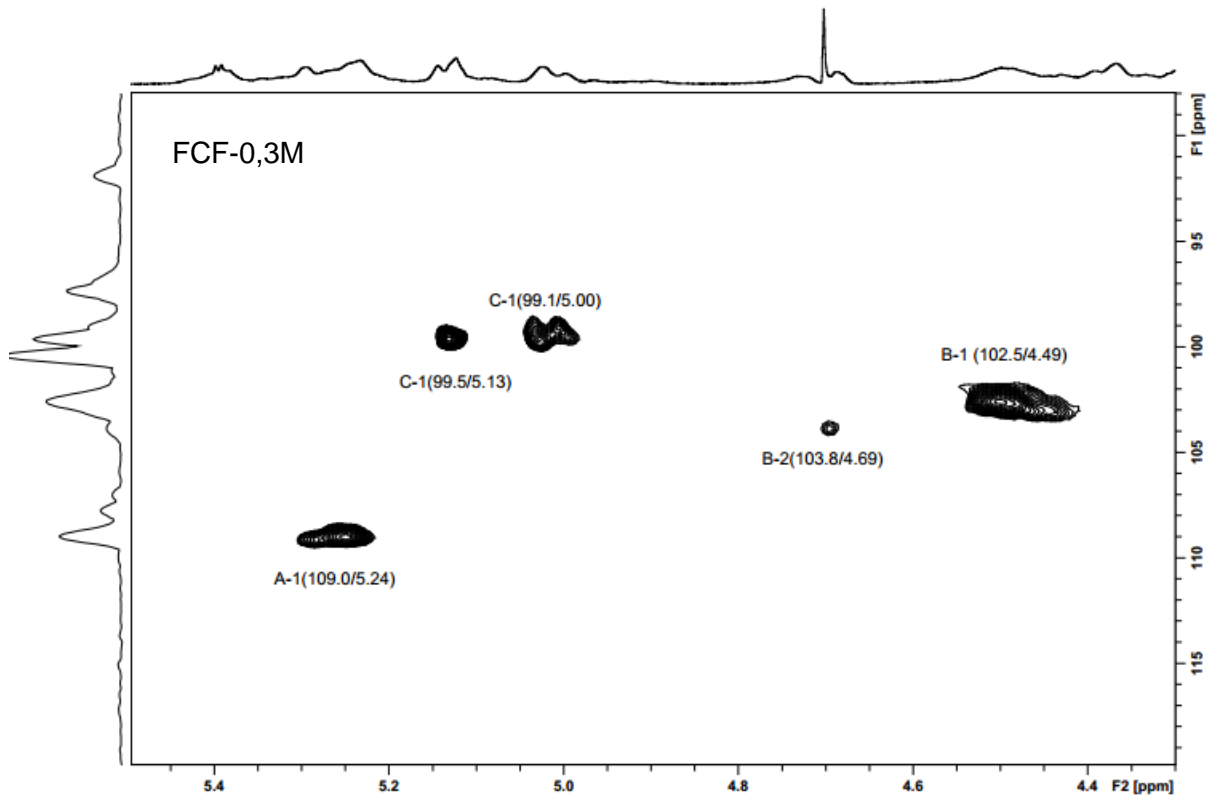
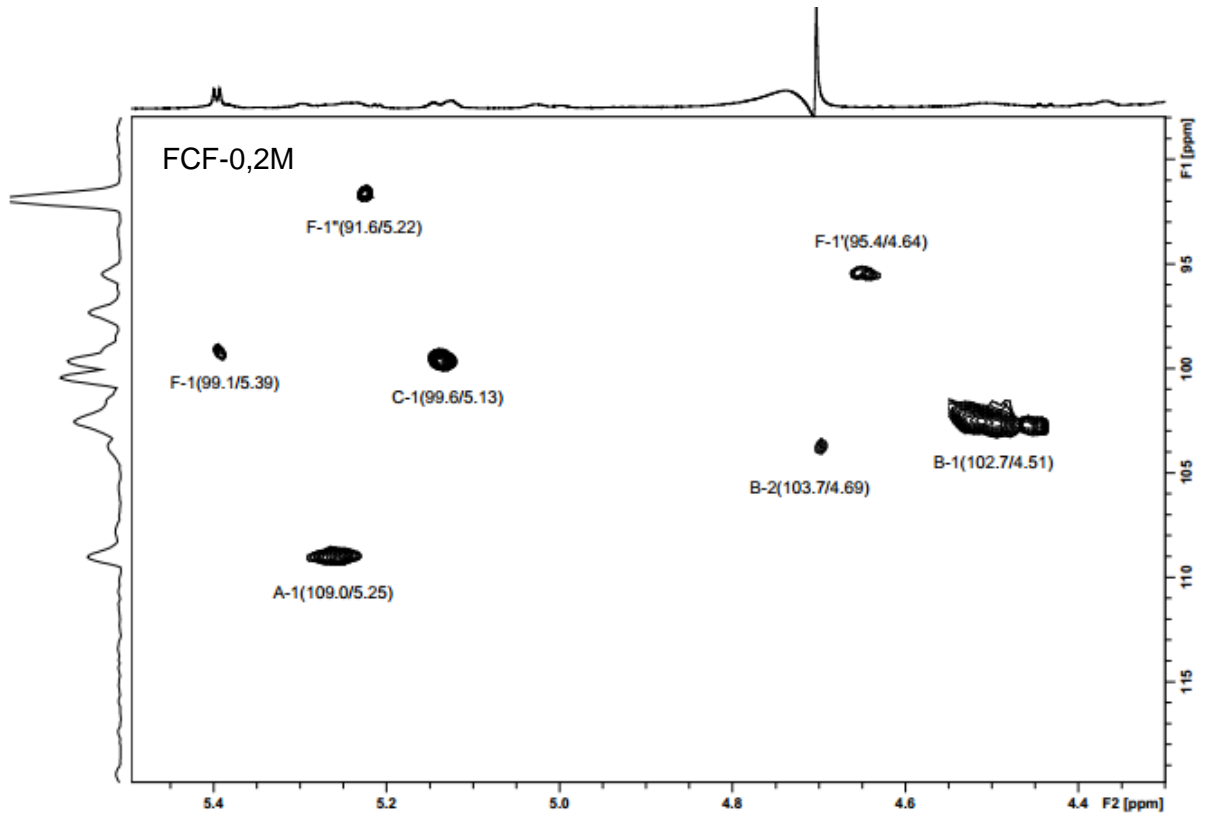


FIGURA 12: Perfis de eluição em HPSEC-MALLS, utilizando detector de índice de refração (RID), das frações FCF-0,1M, FCF-0,2M, FCF-0,3M e FCF-0,5M.





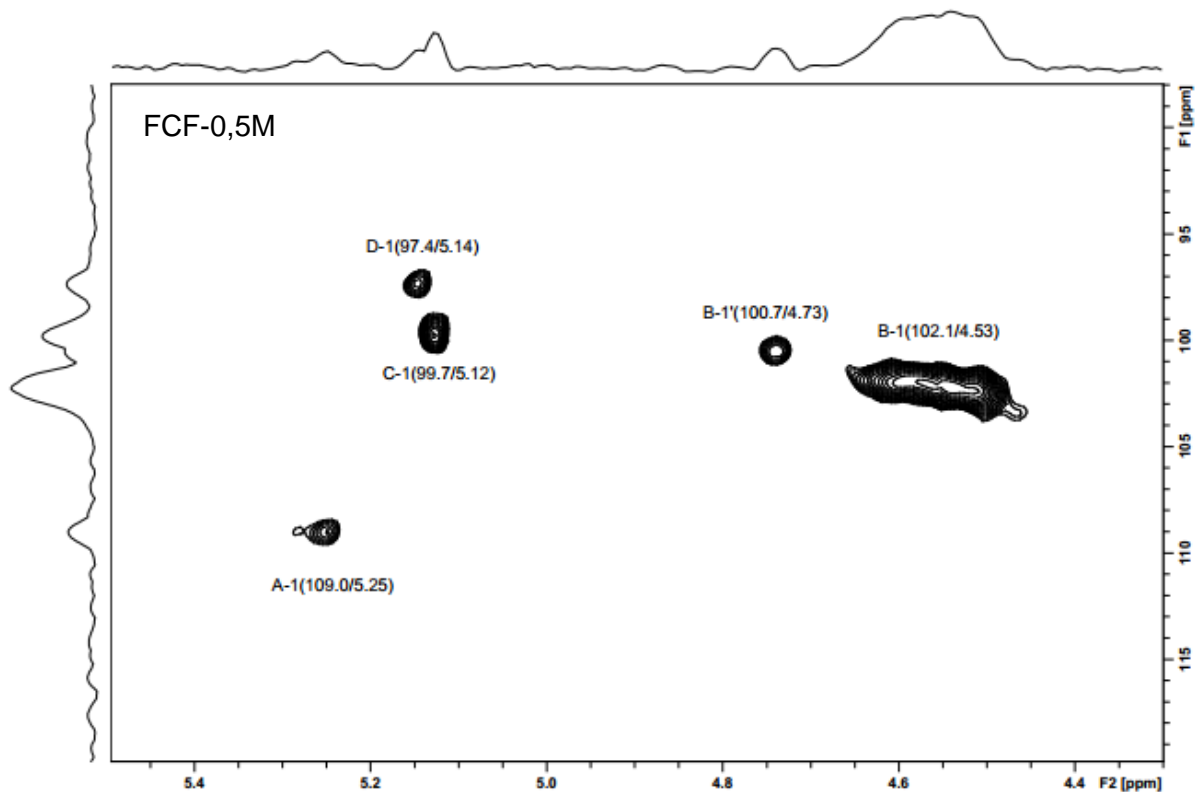


FIGURA 13: Espectros de HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ) da região anomérica das frações F-0M, F-0,1M, F-0,2M, F-0,3M e F-0,5M em  $\text{D}_2\text{O}$ , a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm. A ( $\alpha\text{-L-Araf}$ ); B ( $\beta\text{-Galp}$ ); C ( $\alpha\text{-L-Rhap}$ ); D ( $\alpha\text{-D-GalpA}$ ); E ( $\alpha\text{-D-Manp}$ ); F ( $\alpha\text{-D-Glc}$ ); E-TNR (terminal não redutor da manana).

#### 5.1.1. Análise estrutural da manana

Como foi mostrado anteriormente, a fração escolhida para caracterização da manana foi a PSB, a qual apresentou majoritariamente unidades de manose em sua composição monossacarídica, perfil homogêneo na análise por HPSEC-MALLS (figura 14),  $dn/dc$  de  $0,156\text{ mL/g}$  e  $M_w$  de  $42.800\text{ g/mol}$ .

O espectro de HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ) contém sinais (figura 15) na região anomérica entre  $\delta\ 99.0 - 103.10$  e  $5.0 - 5.27$ . Os sinais em  $\delta\ 99.2/5.09$ ,  $99.0/5.06$  (C-1/H-1) e  $79.5/4.00$ ,  $78.9/3.93$  (C-2/H-2) são típicos de unidade de  $\rightarrow 2,6\text{-}\alpha\text{-D-}$

Manp-(1→ (KOBAYASHI *et al.*, 1994; VINOGRADOV *et al.*, 1998). Também foram observados sinais em  $\delta$  101.4/5.27, 103.0/5.02 e 103.1/5.12 (C-1/H-1) e 79.3/4.09 (C-2/H-2) típicos de unidades de  $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1→ (KOBAYASHI *et al.*, 1995; VINOGRADOV *et al.*, 1998).

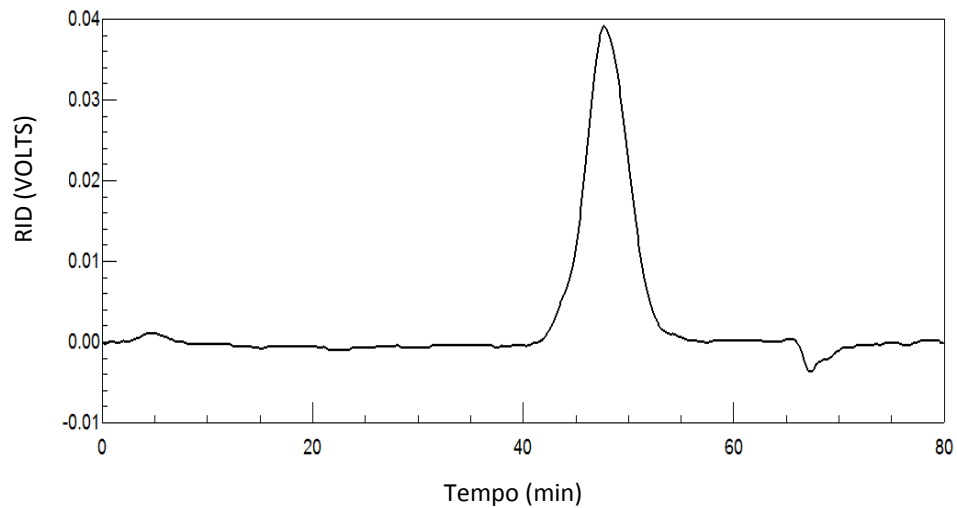


FIGURA 14: Perfil de eluição em HPSEC- MALLS, utilizando detector de índice de refração (RID), da fração PSB.

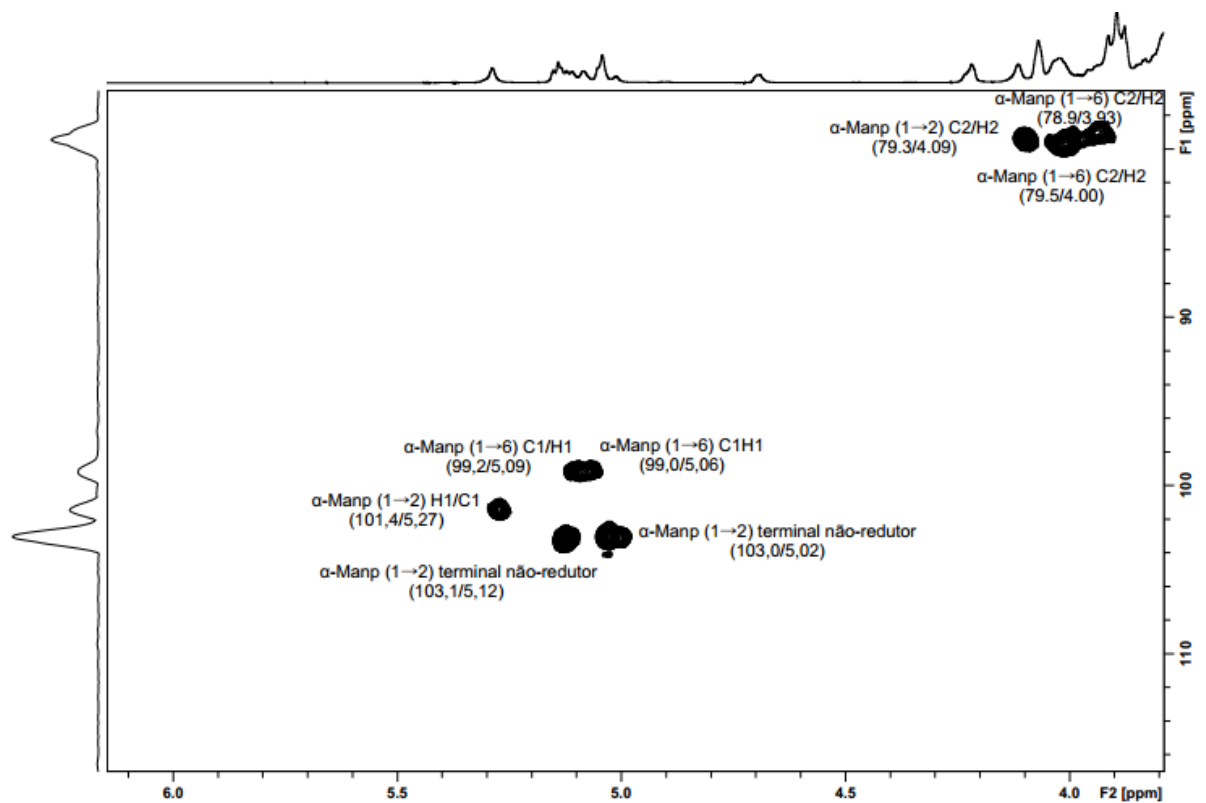


FIGURA 15: Espectro de HSQC (RMN-<sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H) da fração PSB (em D<sub>2</sub>O), a 30 °C, com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm.

A análise da metilação da fração PSB (tabela 4) apresentou 43,0% de terminais não redutores de manose, pela presença de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man. Outros derivados encontrados foram 3,4-Me<sub>2</sub>-Man (42,3%), 2,3,4-Me<sub>2</sub>-Man (7,8%) e 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man (7,0%), indicando que a cadeia principal do polissacarídeo presente nessa fração é composta por unidades de manose 6-O- e 2,6-di-O-substituídas (KOMURA *et al.*, 2010). Esses resultados indicam a presença de uma manana na fração PSB, visto que esse tipo de polissacarídeo é caracterizado por apresentar cadeia principal de (1→6)- $\alpha$ -D-manana, conectadas umas as outras por pontos de ramificação em O-2 (KOBAYASHI *et al.*, 1994; VINOGRADOV *et al.*, 1998). Os terminais não redutores de manose e 3,4,6-Me<sub>3</sub>-Man provavelmente ramificam a cadeia principal nas posições O-2 de unidades de manose. Desta forma, os dados de metilação apresentados na tabela 4 estão em acordo com o resultado obtido pela análise de RMN. A manana encontrada nos vinhos provavelmente é derivada da levedura durante a fermentação (MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013).

TABELA 4: PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO PSB

Derivado metilado	Ligações	mol %
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	Terminal	43,0
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	(1→2,6)	42,3
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	(1→2)	7,0
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	(1→6)	7,8

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o polissacarídeo majoritário encontrado na fração PSB é uma manana. Esse polissacarídeo é formado por uma cadeia principal de unidades  $\alpha$ -D-Manp (1→6) ligadas, substituída em O-2 por curtas cadeias laterais de  $\alpha$ -D-Manp (1→2) ligadas. A figura 16 mostra uma estrutura sugerida para a manana presente na fração PSB.

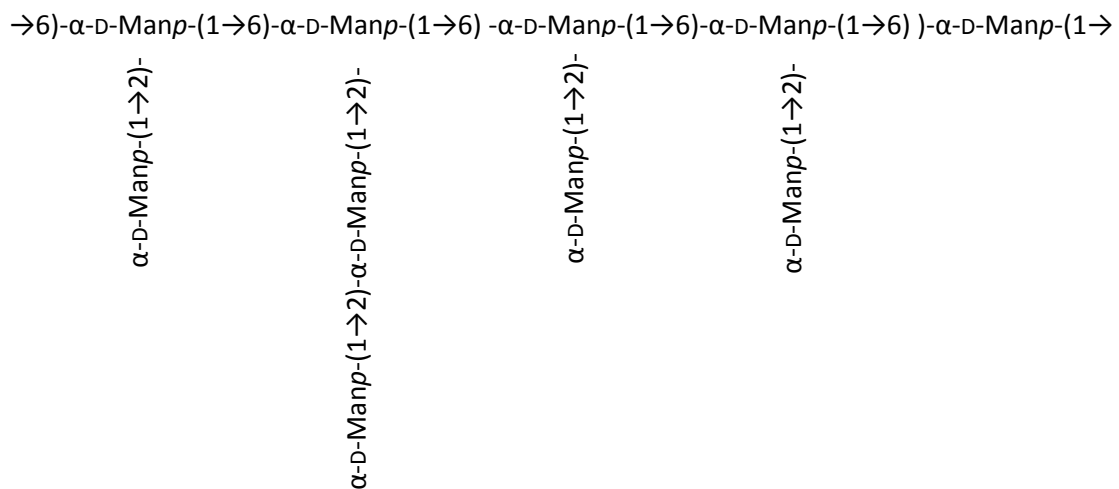


FIGURA 16: Estrutura sugerida para a manana presente na fração PSB.

### 5.1.2. Análise estrutural dos polissacarídeos: arabinogalactana e ramnogalacturonana

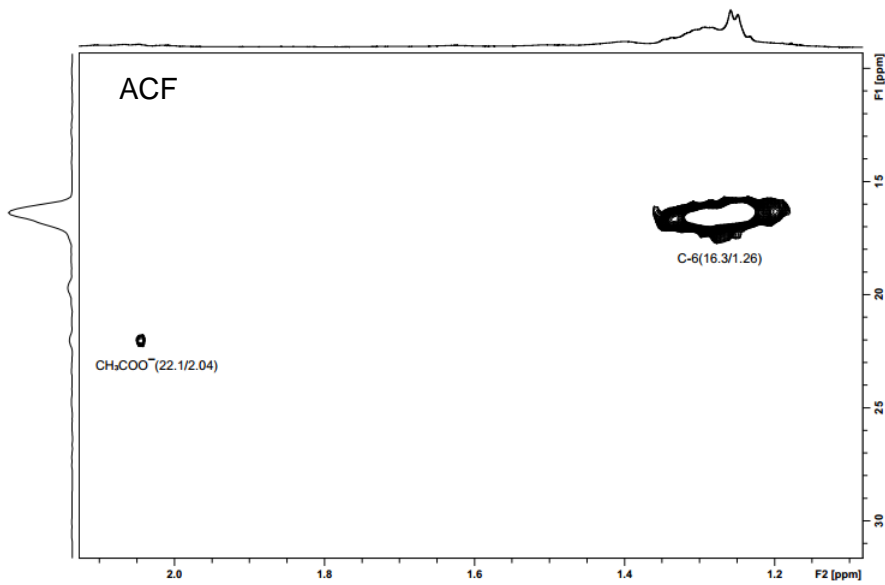
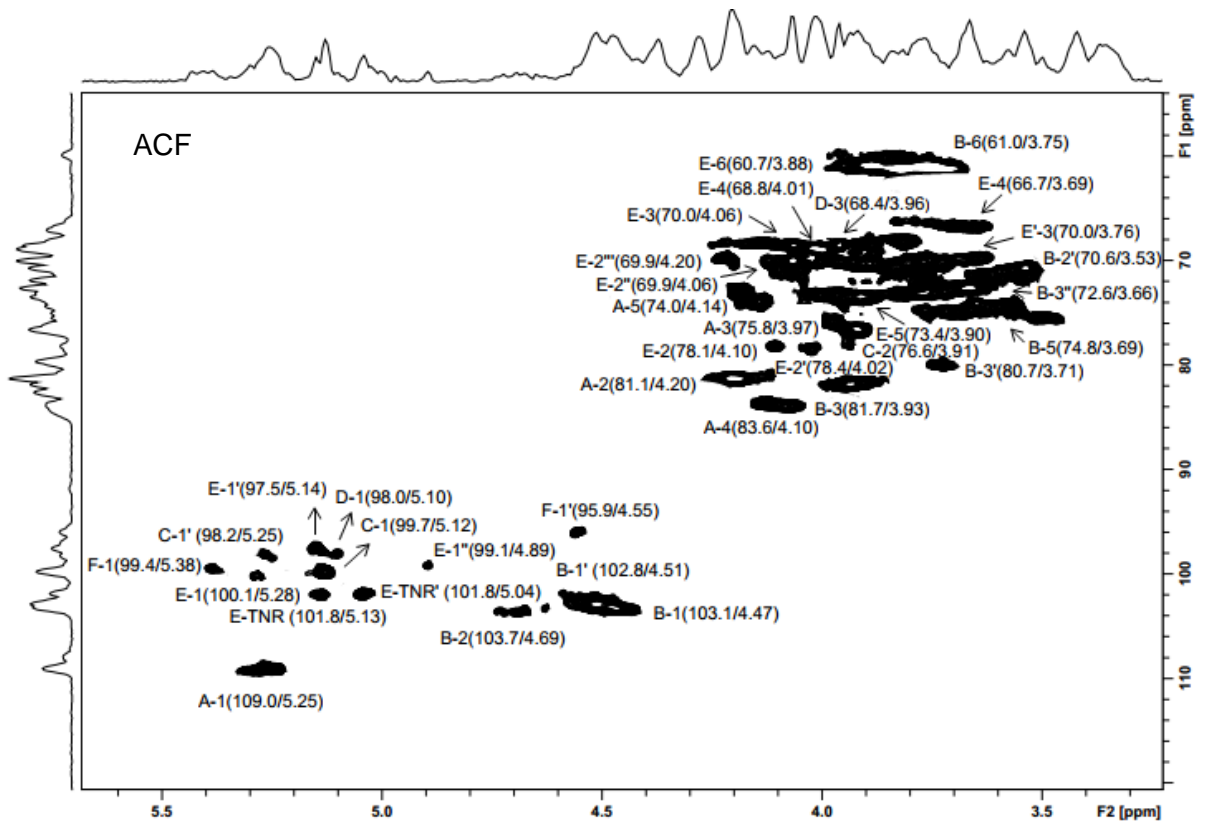
Como já mencionado, as frações ACF, ACS e ASB apresentaram polissacarídeos semelhantes, o que pode ser observado pelo espectro de RMN-HSQC (figura 17) e pela composição monossacarídica (tabela 1). Diante disso, para análise estrutural dos polissacarídeos foram escolhidas as frações ACF, devido ao seu alto rendimento, e a fração derivada dela, FCF-0,3M.

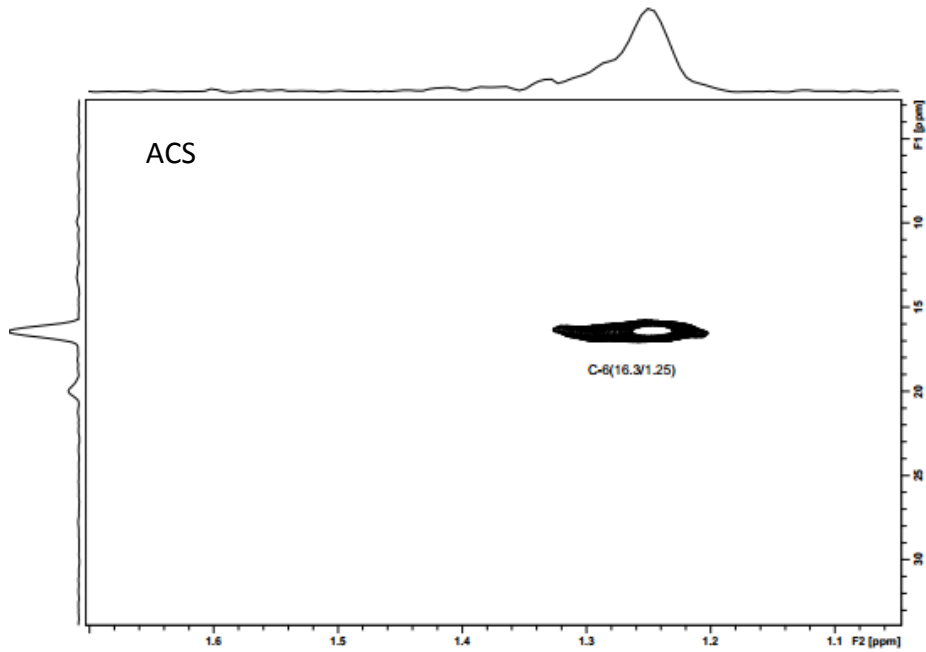
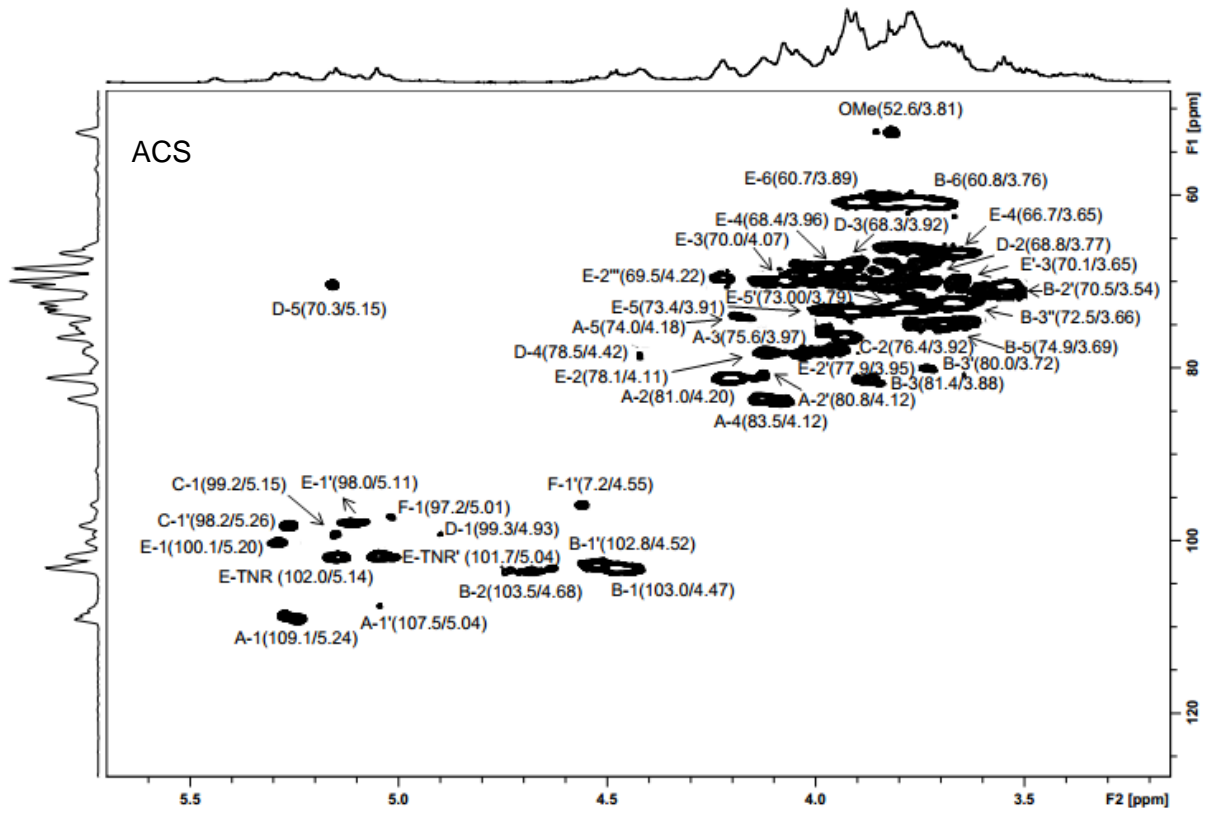
A análise da composição monossacarídica (tabela 3) da fração FCF-0,3M apresentou arabinose (21,1%) e galactose (67,3%) como principais açúcares presentes nos seus polissacarídeos, sugerindo a presença de uma arabinogalactana. Como também, apresentou unidades de ramnose (5,5%) e ácido

galacturônico (6,1%), que sugerem a presença de um polissacarídeo do tipo ramnogalacturonana.

O espectro de HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ) (figura 17) contém sinais em  $\delta$  103.1/4.47, 102.8/4.51 (C-1/H-1), 70.6/3.53 (C-2/H-2), 80.0/3.73 (C-3/H-3 substituído), 68.2/4.13 (C-4/H-4), 74.8/3.69 (C-5/H-5), 61.0/3.69 (C-6/H-6 não substituído) e 69.1/3.93 (C-6/H-6 substituído) típicos de unidades de  $\rightarrow 3,6$ - $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$  e  $\rightarrow 3,6$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$  (GORIN e MAZUREK, 1975; RENARD *et al.*, 1998; DELGOBO *et al.*, 1998, 1999; FRANSEN *et al.*, 2000; TISCHER *et al.*, 2002; CIPRIANI *et al.*, 2006, 2009a). Unidades de Galp 3,6-di-O-substituídas estão presentes em arabinogalactanas do tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Como também, foi possível observar a presença de sinais em  $\delta$  109.0/5.25 (C-1/H-1), 81.1/4.20 (C-2/H-2), 75.8/3.97 (C-3/H-3), 83.6/4.10 (C-4/H-4) e 74.0/4.14 (C-5/H-5) típicos de  $\alpha$ -L-Araf (RENARD *et al.*, 1998; DELGOBO *et al.*, 1998, 1999).

Além disso, o espectro de HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ) (figura 17) apresentou sinais em  $\delta$  98.0/5.10 (C-1/H-1) e 68.4/3.96 (C-3/H-3) típicos de unidades de  $\alpha$ -D-GalpA (1 $\rightarrow 4$ )-ligadas e o sinal em  $\delta$  52.9/3.82 (observado no espectro de ASB) e 52.6/3.81 (observado no espectro de ACS) do metil-éster de unidades de GalpA (RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011). A presença de C-1/H-1 e C-6/H-6 de unidades de Rhap (1 $\rightarrow 2$ )-ligadas foi mostrada pelos sinais em  $\delta$  99.7/5.12 e 16.2/1.26, respectivamente (RENARD *et al.*, 1998). Além disso, a presença de sinal em  $\delta$  22.1/2.04 (figura 17), típico de  $-\text{CH}_3$  de grupo acetil, sugere a presença de ácido galacturônico acetilado na posição O-2 ou O-3 (LEROUGE *et al.*, 1993; POPOV *et al.*, 2011). Unidades de GalA acetiladas nas posições O-2 e/ou O-3, de  $\alpha$ -D-GalpA (1 $\rightarrow 4$ )-ligadas e unidades de Rhap (1 $\rightarrow 2$ )-ligadas são observadas em ramnogalacturonas do tipo I (KOMALAVIVAS e MORT, 1989; LEROUGE *et al.*, 1993; RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011).





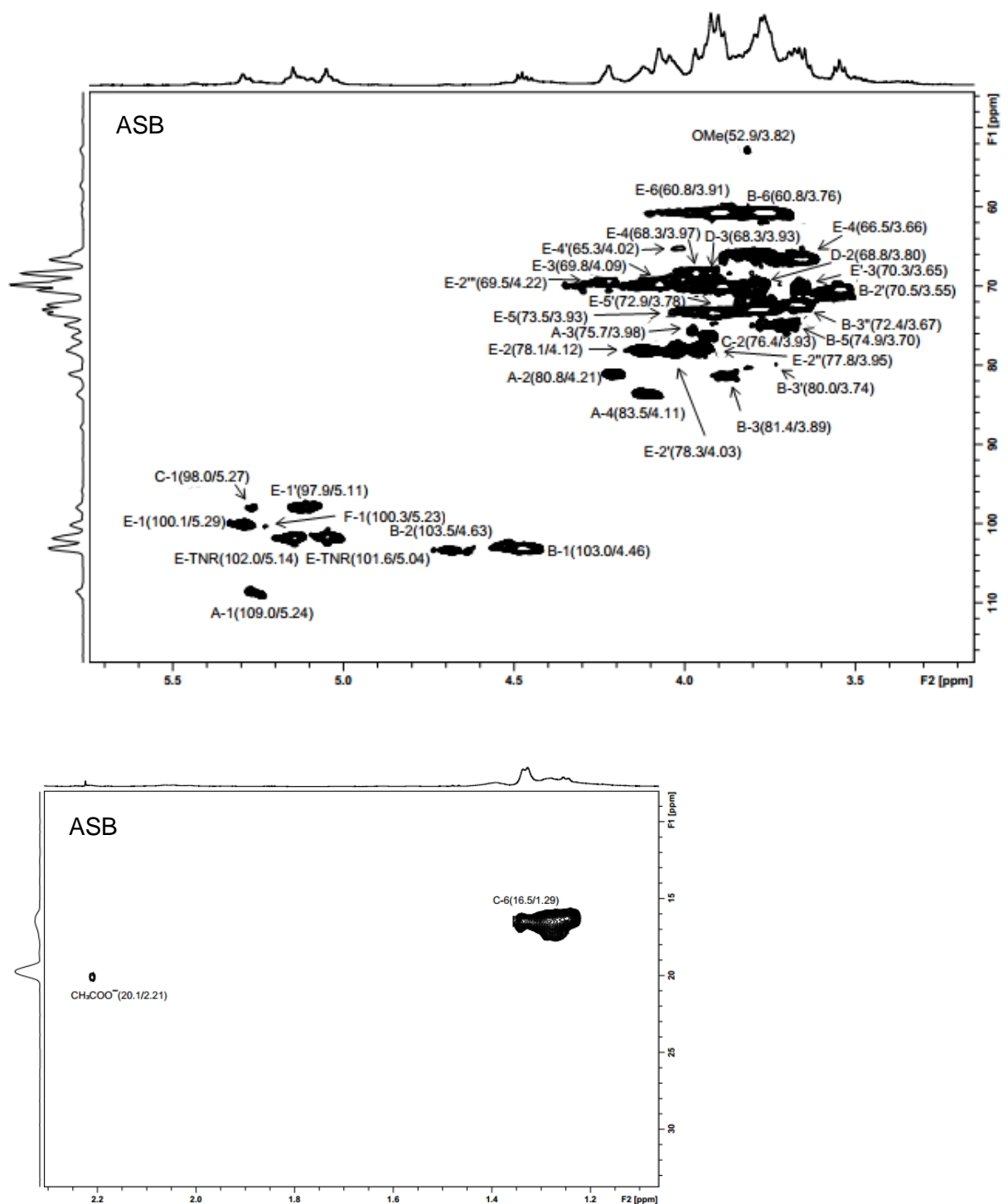


FIGURA 17: Espectros de HSQC (RMN-<sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H) das frações ACF, ACS e ASB (em D<sub>2</sub>O), a 30 °C, com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm. A ( $\alpha$ -L-Araf); B ( $\beta$ -D-Galp); C ( $\alpha$ -L-Rhap); D ( $\alpha$ -D-GalpA); E ( $\alpha$ -D-Manp); F ( $\alpha$ -D-Glc); TNR (terminal não redutor).

A análise de metilação foi realizada com a fração FCF-0,3M carboxirreduzida, visto que nas condições análise utilizada para os acetados de alditóis parcialmente metilados, as unidades de ácidos urônicos, não são analisadas. Após a carboxirredução utilizando NaBD<sub>4</sub>, as unidades de GalA são convertidas em Gal e, assim, podem ser analisadas. A análise de metilação apresentou 9,6% de terminais não redutores de Gal<sub>p</sub>, pela presença do derivado metilado 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal e 5,3% de terminais não redutores de Ara<sub>f</sub>, indicado pela presença do derivado metilado 2,3,5-Me<sub>3</sub>-Ara (tabela 5). Outros derivados encontrados foram 2,4-Me<sub>2</sub>-Gal (41,7%), 2,4,6-Me<sub>3</sub>Gal (1,4%) e 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Gal (43,3%), sugerindo que a cadeia principal desse polissacarídeo é composta por unidades de Gal<sub>p</sub> 3-O-, 6-O- e 3,6-di-O-substituídas. Esses resultados sugerem a presença de uma arabinogalactana do tipo II, uma vez que este tipo de polissacarídeo é caracterizado por apresentar cadeia principal de (1→3) e/ou (1→6) β-D-galactanas, ligadas umas as outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6 (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Os terminais não redutores de Ara<sub>f</sub> provavelmente ramificam a cadeia principal nas posições O-3 de algumas unidades de Gal<sub>p</sub>, como geralmente é observado nas arabinogalactanas do tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Com isso, os dados da metilação apresentados na tabela 5 estão em acordo com o resultado obtido pela análise de RMN.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o polissacarídeo majoritário encontrado em FCF-0,3M é uma arabinogalactana do tipo II. Ela é formada por uma cadeia principal de unidades de β-D-Gal<sub>p</sub> (1→3)-ligadas, substituída em O-6 por cadeias laterais de β-D-Gal<sub>p</sub> (1→6)-ligadas. As cadeias laterais são substituídas em O-3 por terminais não redutores de α-L-Ara<sub>f</sub>. A figura 18 mostra uma estrutura sugerida para a arabinogalactana presente na fração.



TABELA 5 – ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO FCF-0,3M

Derivados metilados	Ligações	mol %
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	→)3-	1,4
2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	→)3,6-	41,7
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	→)6-	43,3
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	Terminal	9,6
2,3,5-Me <sub>4</sub> -Ara	Terminal	5,3
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	Terminal	0,2
3,4-Me <sub>2</sub> -Rha	→)2-	2,3
2,3,6-Me <sub>3</sub> -GalA	→)4-	2,3

NOTA: Análise da fração FCF-0,3M carboxirreduzida com NaBD<sub>4</sub> .

Dessa forma, a fração FCF-0,3M também contém uma ramnogalaturonana do tipo I. Uma estrutura sugerida para essa ramnogalacturonana é mostrada na figura 19.

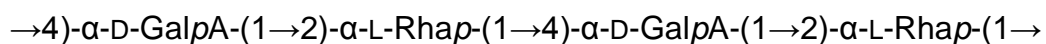
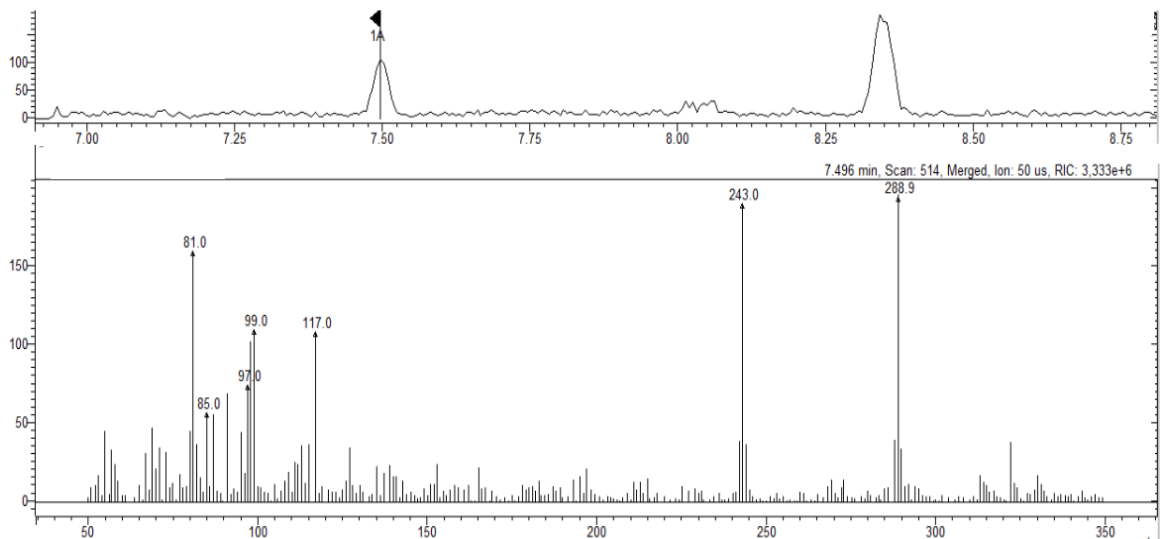


FIGURA 19: Estrutura sugerida para a ramnogalacturonana do tipo I.

Ainda, na análise da composição monossacarídica por GC-MS, foi possível observar a presença de unidades de 2-O-metil-xilose e 2-O-metil-fucose nas frações ACF, ACS e ASB, os quais são marcadores do polissacarídeo ramnogalacturonana do tipo II (VIDAL *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ-CARVAJAL *et al.*, 2003). A figura 20 mostra a presença de 2-O-metil-xilose e 2-O-metil-fucose através do tempo de retenção e fragmentação, sugerindo que, além de uma ramnogalacturonana do tipo I, as frações, provavelmente, apresentam uma ramnogalacturonana do tipo II, embora não tenha sido observados sinais em RMN na região anomérica e na metilação, devido à pequena quantidade desse polissacarídeo, visto que correspondem a menos de 1% dos polissacarídeos encontrados nas frações.

## 2-O-metil-xilose



## 2-O-metil-fucose

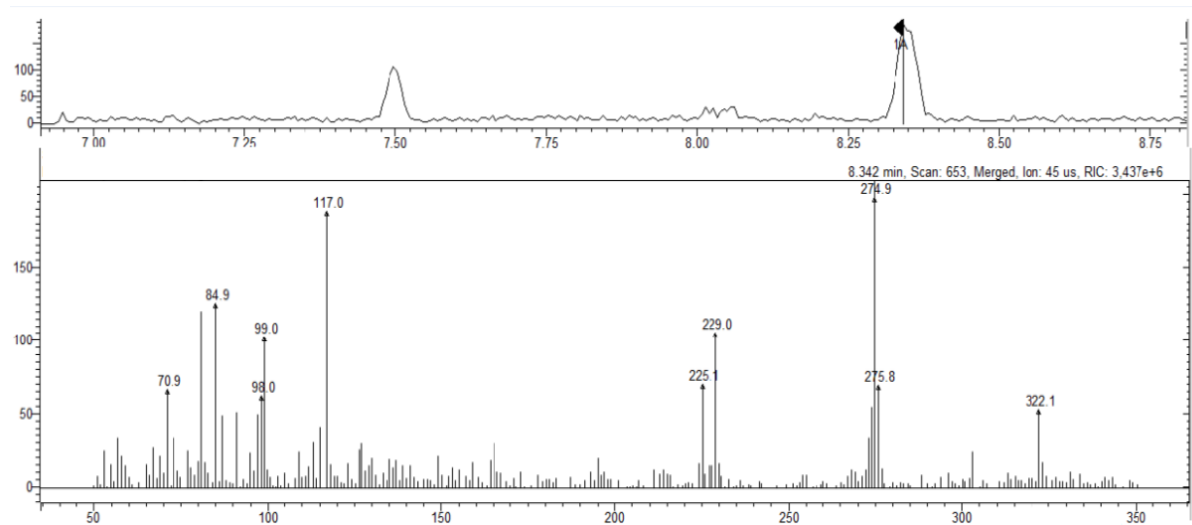


FIGURA 20: Cromatograma e espectro de massas contendo tempo de retenção e fragmentação das unidades de 2-O-metil-xilose e 2-O-metil-fucose encontradas na análise monossacarídica das frações ACF, ACS e ASB.

Os resultados apresentados sugerem que os vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc apresentam em sua composição os polissacarídeos: arababinogalactana do tipo II, ramnogalacturonana do tipo I e II e manana. Os polissacarídeos encontrados nos vinhos são principalmente provenientes das bagas da uva, de onde são derivadas a arababinogalactana do tipo II, ramnogalacturonana do tipo I e II, e originadas da levedura, durante a fermentação de onde deriva a manana (MARTÍNEZ-LAPUENTE *et al.*, 2013). Embora apresentem na estrutura base os mesmos polissacarídeos, as concentrações deles diferenciam entre os vinhos. Diante disso, através da análise em RMN-HSQC, utilizando os valores obtidos pelas integrais dos sinais dos monossacarídeos encontrados na região anomérica dos espectros da fração bruta de cada vinho e pelo tempo de retenção dos monossacarídeos 2-O-metil-xilose e 2-O-metil-fucose no GC-MS foi possível quantificar cada polissacarídeo em relação a quantidade total obtida em cada vinho e fornecer uma impressão digital para cada

vinho, uma vez que os perfis das misturas apresentaram rendimentos e quantidades diferentes, auxiliando para assinatura de cada vinho (tabela 6).

O vinho Cabernet Franc apresenta maior concentração de arabinogalactana do tipo II (70,8%) entre os vinhos, seguido do Cabernet Sauvignon (58,0%) e Sauvignon Blanc (46,0%). O vinho Sauvignon Blanc apresenta maior porcentagem de manana (43,7%), talvez por ser um vinho branco e muitas vezes produzido apenas com a polpa da uva, na ausência da casca, o que pode influenciar e modificar a relação de rendimento entre os polissacarídeos, seguido do Cabernet Sauvignon (28,6%) e Cabernet Franc (10,3%). Como já havia sido observado, a ramnogalacturonana do tipo I apresenta um baixo rendimento nos três vinhos analisados, o vinho Cabernet Franc com melhor rendimento (12,1%), seguido do Cabernet Sauvignon (6,4%) e Sauvignon Blanc (2,0%). A ramnogalacturonana do tipo II teve o rendimento mais baixo entre os polissacarídeos (abaixo de 1%) encontrados e apresentou praticamente a mesma quantidade nos três vinhos. Foi notado também que o vinho Cabernet Sauvignon apresenta rendimento intermediário entre o vinho Cabernet Franc e Sauvignon Blanc para todos os polissacarídeos analisados, isso pode ter acontecido devido a fato de a uva utilizada para produção do vinho Cabernet Sauvignon (uva Cabernet Sauvignon) ser resultado do cruzamento da uva Cabernet Franc (utilizada para produzir o vinho Cabernet Franc) e da uva Sauvignon Blanc (utilizada para produzir o vinho Sauvignon Blanc) (SULLIVAN,1998; CHRISTENSEN *et al.*, 2003; ROBINSON, 2006). Por meio desses resultados foi possível assinar os vinhos analisados nesse trabalho quanto ao rendimento de cada polissacarídeo encontrado, como mostrado na tabela 6.

TABELA 6: RENDIMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DOS VINHOS CABERNET FRANC, CABERNET SAUVIGNON E SAUVIGNON BLANC

<b>Polissacarídeo</b>	<b>Cabernet Franc (%)</b>	<b>Cabernet Sauvignon (%)</b>	<b>Sauvignon Blanc (%)</b>
Arabinogalactana do tipo II	70,8	58,0	46,0
Ramnogalacturonana do tipo I	12,1	6,4	2,0
Ramnogalacturonana do tipo II	0,5	0,3	0,3
Manana	10,3	28,6	43,7
Dextrina	6,3	6,9	8,1

## 5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS POLISSACARÍDEOS *IN VITRO*

### 5.2.1. Efeito das frações ACF, ACS e ASB sobre a atividade celular de macrófagos da linhagem RAW-Blue

A avaliação da atividade celular foi realizada pela medida da alteração induzida pelas frações ACF, ACS e ASB sobre a atividade metabólica de células viáveis. Esse método se baseia na medida do metabolismo celular de glicídeos, através da avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais. A atividade celular é quantificada pela redução dos sais tetrazólio, por meio de reação enzimática, catalisada pela succinato desidrogenase, que cliva o anel dos sais, convertendo a formazan, de cor púrpura, a qual é detectada no comprimento de onda de 590 nm. Desta forma, a quantidade de formazan produzida é diretamente

proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; MACIEL *et al.*, 2002; KWON; HA, 2012).

O teste foi realizado com as frações nas concentrações entre 2- 200 µg/mL (2 µg/mL, 20 µg/mL e 200 µg/mL) nos tempos de 24 e 48 h. Os resultados obtidos demonstraram que as frações testadas não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle utilizado (veículo), nenhuma das concentrações testadas alterou o metabolismo celular, como demonstrado na figura 21. Com isso, os testes com célula Raw-Blue podem ser realizados até a concentração de 200 µg/mL.

Estudos já mostraram que polissacarídeos provenientes de *Opuntia polyacantha*, constituídos de Gal, Xyl, Ara, Rha e GalA, não alteraram a atividade celular de macrófagos da linhagem J77A.1, mesmo nas dosagens mais altas (100 a 800 µg/mL) (SCHEPETKIN *et al.*, 2008). Resultado semelhante, foi obtido pelas frações ácidas (200 a 1.600 µg/mL), constituídas por polissacarídeos compostos de Gal, Ara, Rha e GalA de *Tanacetum vulgare* sobre a mesma linhagem celular mencionada (XIE, SCHEPETKIN e QUINN, 2007). Polímero obtido de *Anadenanthera colubrina*, composto de Ara, Man, Gal, Rha e Glc, também não alterou o metabolismo celular em cultura primária de macrófagos peritoneais murinos (DELGOBO *et al.*, 1998; MORETÃO *et al.*, 2003).

Frações polissacarídicas neutras (0,3 a 1.000 µg/mL), ricas em Man e Glc, obtidas de extrações aquosas de espécies do gênero *Dendrobium* spp. (*D. officinale*, *D. fimbriatum*, *D. nobile*, *D. chrysotoxum*, *D. huoshanense* e *D. officinale*) não alteraram a atividade celular em tratamento de 24 h em linhagem de macrófagos RAW 264.7 (MENG *et al.*, 2013).

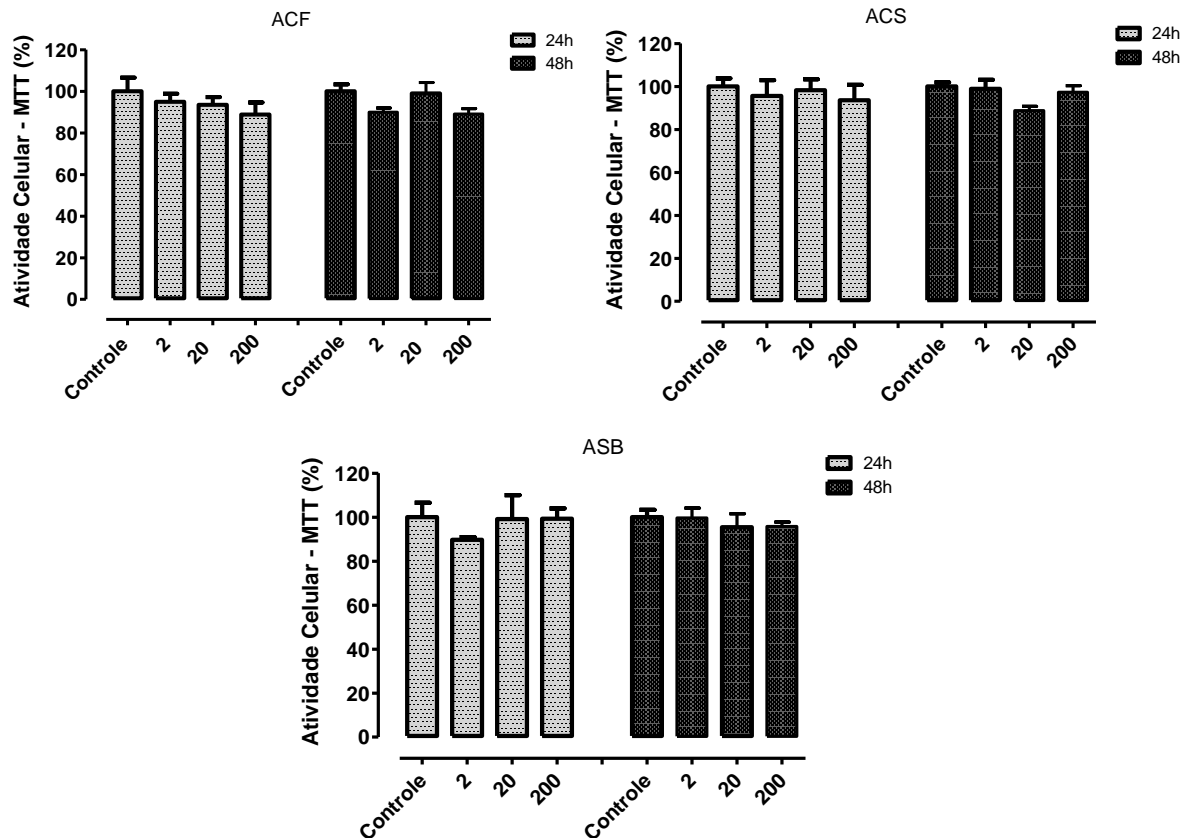


FIGURA 21: Efeito das frações ACF, ACS e ASB após tratamento de 24 e 48 h sobre a atividade celular de macrófagos (RAW-Blue).

NOTAS: Controle: Controle negativo composto somente pelo meio DMEM suplementado com soro fetal bovino; Soluções das frações ACF, ACS e ASB nas concentrações de 2, 20, 200 µg/mL.

### 5.2.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória das frações ACF, ACS e ASB

O teste realizado se baseou em expor a linhagem celular RAW-Blue às frações ACF, ACS e ASB, na presença do estímulo inflamatório lipopolissacarídeo (LPS). Nesse experimento foi escolhida uma concentração dentro da faixa testada quanto à alteração da atividade celular da linhagem RAW-Blue (100 µg/mL) para uma avaliação inicial do potencial anti-inflamatório das frações ACF, ACS e ASB. A detecção colorimétrica da proteína fosfatase alcalina embrionária secretável expressa feita no teste indicou, indiretamente, que as substâncias testadas foram

capazes de inibir as vias de NF- $\kappa$ B e/ou AP-1 (figura 22), uma vez que praticamente não houve alteração dos grupos tratados com as frações ACF, ACS e ASB em relação ao controle negativo, e mostraram diferença significativa quando comparados com o grupo positivo ( $p < 0,001$ ). Esse foi um teste preliminar e, portanto, serão necessários outros testes para comprovação dos resultados. No entanto, esses resultados sugerem que os polissacarídeos das frações avaliadas provavelmente apresentam potencial anti-inflamatório quando testadas *in vitro*.

Muitos polissacarídeos isolados de plantas demonstram resposta imunológica *in vivo* e *in vitro*. Existem muitos relatos de resistência não específica induzida por polissacarídeo contra diversos patógenos microbianos (RUTHES *et al.*, 2012). Estudos mostraram que polissacarídeos isolados a partir de *Agaricus bisporus*, *Lactarius rufus* (RUTHES *et al.*, 2012), *Panax ginseng* (LIM *et al.*, 2002) e *Bacteroides fragilis* (TZIANABOS *et al.*, 1995), apresentaram efeito anti-inflamatório. Pesquisas mostraram que pectinas de pimentão (POPOV *et al.*, 2011) e aipo (OVODOVA *et al.*, 2009) atuam inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo *in vivo* induzido por LPS.

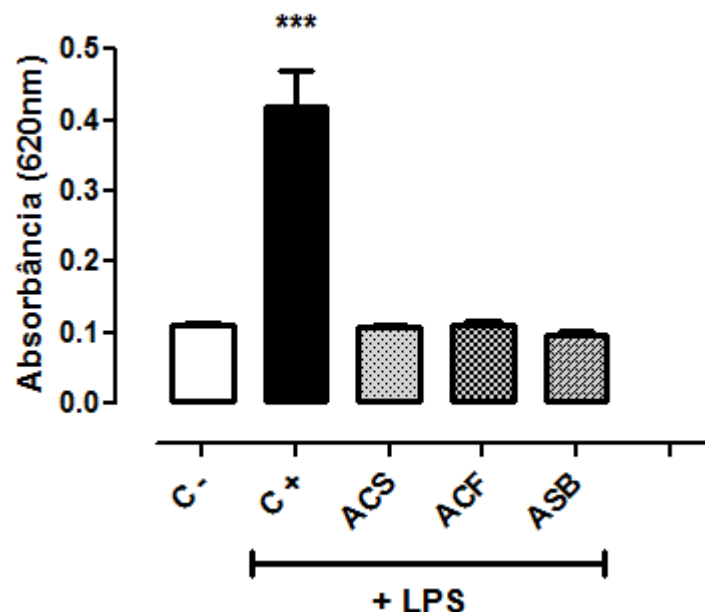


FIGURA 22: Efeito das frações ACF, ACS e ASB na inibição de NF- $\kappa$ B em linhagem de célula RAW-Blue.

NOTAS: C+: LPS 100 µg/mL; C-: controle negativo, DMEM suplementado com soro fetal bovino; Soluções das frações ACF, ACS e ASB na concentração 100 µg/mL; (\*\*\*) Diferença significativa em relação ao controle negativo e às frações, segundo o teste de Tukey ( $p \leq 0,001$ ).

## 6. CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- Os vinhos Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon e Sauvignon Blanc apresentam 0,16%, 0,05% e 0,02%, respectivamente, de polissacarídeos.
- Os polissacarídeos encontrados nos vinhos estudados foram: arabinogalactana do tipo II, ramnogalaturonana do tipo I e II, manana e dextrina.
- O polissacarídeo majoritário presentes nos três vinhos é uma arabinogalactana tipo II. Ela é formada por uma cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas, substituída em O-6 por cadeias laterais de  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas. As cadeias laterais são substituídas em O-3 por terminais não redutores de  $\alpha$ -L-Araf.
- A ramnogalaturonana do tipo I encontrada é formada pela repetição da unidade dissacarídica [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ )].
- A manana presente nos vinhos estudados é um polissacarídeo constituído por uma cadeia principal de unidades  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 6) ligadas, substituída em O-2 por cadeias laterais curtas de  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 2) ligadas.
- Embora, tenham os mesmos polissacarídeos, as concentrações deles variam entre os vinhos. Com isso, foi possível fornecer um “*fingerprint*” para cada vinho, uma vez que os perfis das misturas apresentaram rendimentos e quantidades diferentes, auxiliando para a assinatura dos vinhos analisados.
- As frações ACF, ACS e ASB nas concentrações entre 2- 200  $\mu$ g/mL, não alteraram a atividade celular quando testadas na linhagem RAW-Bue.
- Os resultados obtidos sugerem que os polissacarídeos das frações avaliadas provavelmente são capazes de inibir a translocação as vias de NF- $\kappa$ B e/ou AP-1, apresentando potencial anti-inflamatório quando testadas *in vitro* na dose de 100  $\mu$ g/mL. Contudo, os testes ainda são preliminares, sendo necessários outros testes para comprovação dos resultados.

## 7. REFERÊNCIAS

ABAD, F. B.; PLASENCIA, J. M. B. **Consumo moderado de bebidas alcohólicas: salud y civilización**. Madrid: Inesiba, 135 p, 1993.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 468p, 2000.

ABEL, G.; CZOP, J. L. Stimulation of human monocyte  $\beta$ -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ . **Internat. J. Immunopharmacol.**, v. 14, p. 1363-1373, 1992.

ADACHI, Y.; OHNO, N.; YODAMAE, T. Inhibitory effects of  $\beta$ - glucan on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages in vitro. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 16, p 462-467, 1993.

ADRIAN, M.; JEANDET, P.; BREUIL, A. C.; LEVITE, D.; DEBORD, S.; BESSIS, R. Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection High Performance Liquid Chromatography. **American Journal of Enology & Viticulture**, Davis, v. 51, n. 1, p. 37-40, 2000.

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. **Progress in biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v. 14, p. 47-55, 1996.

AMERINE, M. A. Le vin dans l'alimentation humaine. **Bulletin de l'O.I.V.** Paris, número especial, p. 137-151, 1977.

APOLLINAR-VALIENTE, R.; WILLIAMS, P.; AZEROLLES, G.; ROMERO-CASCALES, I.; GÓMEZ-PLASA, E.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; ROS-GARCÍA, J.; DOCO, T. Effect of enzyme additions on the oligosaccharide composition of Monastrell red wines from four different wine-growing origins. **Food Chemistry**, v. 156, p. 151-159, 2014.

ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. New York, p. 429-430, 1959.

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

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

ATMODJO, M. A.; HAO, Z.; MOHNEN, D. Evolving views of pectin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 64, p. 747-749, 2013.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p.143, 1997.

AYESTARAN, B.; GUADALUPE, Z.; LEON, D. Quantification of major grape polysaccharides (Tremanillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 29-39, 2004.

BALLOU, C.E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **Journal of Biological Chemistry**, v.245, n.5, p.1197-1203, 1970.

BARRETO-BERGTER, E.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Cell constituents of the mycelia and conidia of *A. fumigatus*. **Carbohydrates Letters**, 95 (1): 205-218, 1981.

BARTNICKI-GARCIA, S; LIPPMAN, E. Fungal morphogenesis: Cell wall construction in *Muca rouxii*. **Scienc**, 1659(1): 302-304, 1969.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**, 53/5, 2009.

BORGES, E. P. **ABC ilustrado da vinha e do vinho**. 2. ed. Rio de Janeiro: Mauad, 2008.

BOHN, J. A.; Be MILLER, J. N. 1 →3 β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3-14, 1995.

BOURZEIX, M. Raisin, vin, nutrition et santé. Les catéchines et proanthocyanidols du raisin et du vin. **Progrés Agricole et Viticole**, Montpellier, v. 106, n. 22, p. 487-491, 1989.

BORDIGA, M.; TRAVAGLIA, F.; MEYRAND, M; GERMAN, J. B.; LEBRILLA, C. B.; COISSON, J. D. Identification and characterization of complex bioactive oligosaccharides in white and red wine by a combination of mass spectrometry and gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3700-3707, 2012.

BRADFORD; M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CABIB, E. Molecular aspects of yeast morphogenesis. **Annual Review of Microbiology**, 29: 191-214, 1975.

CAPEK, P.; HRIBALOV£, V.; SVANDOV£, E.; EBRINGEROV£, A.; SASINKOV£, V., MASAROV£, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 113-119, 2003.

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

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

CHIU-TSUN TANG P, NG Y-F, HO S, GYDA M, CHAN S-W. Resveratrol and cardiovascular health – promising therapeutic or hopeless illusion? **Pharmacological Research**, 90:88–115, 2014.

CHRISTENSEN, P. L., DOKOOZLIAN, N. K, M., WALKER, WOLPERT, M. A. J. Wine Grape Varieties in California. University of California, **Agricultural and Natural Resources** Publications: Oakland. 2003.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S. Polysaccharide from a tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, L. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal, **Food Chemistry**. V115. p. 687-690, 2009a.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. IACOMINI, M. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p.361-363, 2009b.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COPELLO, M. Vinho. **Revista Adega**. Ed.31. 2008.

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

CRUZ, INÊZ. *A Vitis vinifera e as demais Vitis*. **Saúde de Viver**. p.63-95. 2006.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SIMONE M.M. PAIVA, S. M. M.; CAMILA T. SCOPARO, C. T.; MARCELLO IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; YANNA D. RATTMANN, Y. D.; SASSAKI, G. L. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: A potential adjuvant in sepsis treatment. **Carbohydrate Polymers**, 1776–1782, 2013.

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

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

DEY, P.M.; BROWNLEADER, M.D.; HARBORNE, J.B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 6-9. 1997.

DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; LILJEBACK, T. H. A.; MICHAELSEN, T. E. The malian medicinal plant *Trichilia emetica*; study on polysaccharides with complement fixing ability. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 8, p. 279-287, 2003.

DOCOT, T.; QUELLEC, N.; MOUTOUNET, M.; PELLERIN, P.; Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. **American Journal of nology and Viticulture**, v. 50, p. 28-32, 1999.

DOCOT, T.; WILLIAMS, P.; CHEYNIER, V.; Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatment on wine polysaccharide composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6643-6649, 2007.

DUCASSE, M. A.; WILLIAMS, P.; MEUDEC, E., CHEYNIER, V.; DOCOT, T. Isolation of Carignan and Melot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 747-754, 2010.

DUCASSE, M. A.; WILLIAMS, P.; CANAL-LLAUBERES, R. M.; MAZEROLLES, G.; CHEYNIER, V.; DOCO, T. Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Melot red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6558-6567, 2011.

ESTREICHER, S. K., Ed. **Wine: From Neolithic Times to 21st Century**. Nova York: Algora, 1 ed. 2006.

FARKAŠ, V. Polysaccharide Metabolism. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. The yeasts: metabolism and physiology of yeasts, 2ed. London: **Academic Press**, Vol.3, cap. 9, p. 317-366. 1989.

FENGEL, D.; WEGNER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **Berlin: Gruyter**, W. 613p. 1989.

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

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

FRANSEN, C. T. M.; HASELEY, S. R.; HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 539-547, 2000.

GUADALUPE, Z.; AYESTARAN, B. Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempanillo red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10720-10728, 2007.

GEORGE, R. The Wine. **Simon & Schuster Pocket Wine Label Decoder**, 1989.

GOLDMAN, D. Characteristics of the  $\beta$ -glucan receptor of murine macrophages. **Exp. Cell Res.**, v. 174, p. 481-490, 1988.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in <sup>13</sup>C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, p. 1212-1222, 1975.

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

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M.; **J. Biol. Chemistry**, 177, 751. 1949.

GRAINGER, K.; TATTERSALL, H., Eds. **Wine Production: Vine to Bottle**. Oxford: Blackwell, p.127, 1 ed. 2005.

GUERRA, C. C. Maturação e Colheita. In: GUERRA, C. C. **UVA para processamento Pós-colheita**. Brasília: Embrapa, 2003.

GUERRA, C. C. et al. Conhecendo o Essencial sobre Uvas e Vinhos. 2009. Disponível em:<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>>. Acesso em: 20/06/2015.

HALÁSZ, A., LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. New York, **CRC press**, 312p, 1991.

HOFFMAN, ALEXANDRE. Sistema de produção de destilado de vinho. **EMBRAPA**. 2009.

HOUGH, J. S. Biotecnologia de la cerveza y de la malta. Zaragoza, **Acribia**. 194.p. 1990.

INGOLFSDOTTIR, K.; JURCIR, K.; FISCHER, B.; WAGNER, H. Immunologically active polysaccharide from *Cetraria islandica*. **Planta Médica**, v. 60, p. 527-531, 1994.

INNGJERDINGEN, K. T.; DEBES, S. C.; INNGJERDINGEN, M.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 101, p. 204-214, 2005.

JACKSON, R. S., Ed. Wine Science: Principles and Applications. **Califórnia: Elsevier**, 3 ed. 2008.

JANNIN, B.; DELMAS, D.; CHERKAOUI MALKI, M.; LATRUFFE, N. Étude du mécanisme d'action du resvératrol, un polyphénol du vin, sur la prolifération cellulaire. **Bulletin de l'O.I.V.**, Paris, v. 74, n. 839-840, p. 54-60, 2001.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Journal of Chemistry Society*, **Chemistry Communications**, v. 48, p. 1-70, 1976.

JOHNSON, H. Vintage: The Story of Wine. **Simon & Schuster**. p.11-16.1989.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 36-38, 1965.

KAKURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 195-203, 2000.

KARDOSOVÁ, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFOLDI, J.; NOSAL'OVA, G.; MATAKOVA, T.; HRIBALOVA, V. Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 165-176, 2004.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 239-256, 2002.

KOBAYASHI, H.; WATANABE, M.; KOMIDO, M.; MATSUDA, K.; IKEDA-HASEBE, K.; SUZUKI, M.; SHIBATA, N.; HISAMICHI, K.; SUZUKI, Assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of a D-mannan composed of  $\alpha$ -(1 ~ 2) and  $\beta$ -(1 ~ 6) linkages obtained from *Candida kefyr* IFO 0586 strain. **Carbohydrate Research**, 267 299-306, 1995.

KOMALAVILAS, P.; MORT, A. J. The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 261-272, 1989.

KOMURA, D. L.; RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; ALQUINI, G.; ROSA, M. C. C.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. The origin of mannans found in submerged culture of basidiomycetes. **Carbohydrate Polymers**, volume 79, pag. 1052–1056, 2010.

KUHN, G. B., Ed. **UVA para processamento Produção**. Brasília: Embrapa, 1. ed. 2003.

LAROUSSE DO VINHO. Edição brasileira atualizada. 2ª edição, 2007.

LASKY, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific information during inflammation. **Science**. 258, 964-969, 1992.

LEROUGE, P., O'NEILL, M. A., DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P. Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. **Carbohydrate Research**, v. 243, p. 359-371, 1993.

LEWIN, B. Wine Myths and Reality. **Vendage** Press: Dover, DE. 2010.

LI, J-p. & VLODAVSKY, I. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. **Thrombosis Haemostasis**. 102: 823–828, 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, n. 3, p. 429- 438, 2002.

MARTÍNEZ-LAPUENTE, L.; GUADALUPE, Z.; AYESTARAN, B.; ORTEGA-HERAS, M.; PEREZ-MAGARINO, S. Changes in polisaccharide composition during sparkling wine marking and aging. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12362-12373, 2013.

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

MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; NOLETO, G. R.; CIPRIANI, T. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1479-1483, 2005.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, Oxford, v.47, p. 715-721, 1998.

MENG, L. Z.; LV, G. P.; HU, D. J.; CHEONG, K. L.; XIE, J.; ZHAO, J.; LI, S. P. Effects of polysaccharides from different species of *Dendrobium* (Shihu) on macrophage function. **Molecules**, vol. 18, n. 5, p. 5779-5791, 2013.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C., Eds. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Madrid: Springer. 2009.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M. P.; ZAMPRONIO, A. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v. 93, p. 189-197, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunology**. 24: 327-334, 2003.

NAKAMURA, H. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. **J. Clin Invest**. 89, 1478-1484, 1992.

NATHAN, C.F. Regulation of macrophages oxidative metabolism and antiparasitic activity. In: van FURTH, R. **Mononuclear phagocytes. Characteristics, physiology and function**. Boston: Martinus Nijhoff, p. 411-420, 1985.

NATHAN, C. & XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell, Cambridge**, v. 78, p. 915-918, 1994.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; STOCLET, J.C.; SCHINI-KERTH, V.B. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. **Biochemistry Biophys Research Commun**. 310(2):371-7. 2003

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, M.; LOBYSHEVA, I.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINI-KERTH, V.B. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. **FASEB J**. 2005 Mar;19(3):455-7. Epub 2004.

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

NERGARD, C. S.; MATSUMOTO, T.; INNGJEERDINGEN, M.; INNGJEERDINGEN, K.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; KIYOHARA, H.; PAULSEN, B. S.; YAMADA, H. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex walp. (Asteraceae) **Carbohydrates Research**, v. 340, p. 115-130, 2005.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; THOMAZSOCCOL, V.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular Cell. Biochemistry**, v. 233, p. 73-83, 2002.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and their effects on peritoneal macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 113-122, 2004.

NORTHCOTE, D. H.; HORNE, R. W. The Chemical composition and structure of the yeast cell wall. **Biochemical Journal** 51: 232-236, 1952.

OAK MH, EL BEDOUI J, SCHINI-KERTH VB. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **J Nutr Biochemistry**, Jan;16(1):1-8. . 2005.

O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: DEY, D. M. **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, p. 415-441, 1990.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall formation and structure. **Micron**, v.29, n.2/3, p.207-233, 1998.

OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; PADERIN, N. M.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. **Food Chemistry**, v. 114, p. 610-615, 2009.

PARISH, C.R. The role of Heparan sulphate in inflammation. **Nature Reviews Immunology**. 6: 633-643. 2006.

PAULSEN, B. S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Current Organic Chemistry**, vol. 5, p. 939-950, 2001.

PELLERIN, P.; VIDAL, S.; WILLIAMS, P.; BRILLOUET, J. M. Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. **Carbohydrate Research** 277, 135- 143, 1995.

PELLERIN, P.; DOCO, T.; VIDAL, S.; WILLIAMS, P.; BRILLOUET, J. M.; O'NEILL, M. A. Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Research** 290, 183-197, 1996.

PÉREZ, S.; MAZEAU, K.; PENHOAT, H. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 32, n. 1/2, p. 37-55, 2000.

PIERARD, G. E.; ESTRADA, J. A.; FRANCHIMONT, C. P.; THIRY, A.; STYNEN, D. Immunohistochemical expression of galactomannan in the cytoplasm of phagocytic cells during invasive aspergillosis. **American Journal Clinical Pathology**, v. 96, p. 373-376, 1991.

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

PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: Hemicellulose and hemicellulases., London: Portland Press **Research Monograph**, p. 1-27, 1993.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. Effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages

and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydrate Polymers.**, v. 50, p. 79-83, 2002.

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

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 271-280, 1998.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J.; MANFROI, L. Processo de Produção. In: Processamento de Uva, Vinho Tinto, Graspas e Vinagre: **Embrapa**, 2004.

ROBINOW, C.F.; JOHNSON, B.F. Yeast cytology: An overview. In: ROSE, A.H. HARRISON, J.S. The Yeasts: yeast organelles, 2nd ed. London: **Academic Press**, v.4, cap. 2, p. 7-120,1991.

ROBINSON, J. **Oxford Companion to Wine**. 3rd Edition. Oxford University Press: London. 2006.

RODRIGUEZ-CARVAJAL, M. A. et al. The three-dimensional structure of the megaoligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: A combined molecular modeling and NMR investigation. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 651-671, 2003.

ROTCHES-RIBALTA M, ANDRES-LACUEVA C, ESTRUCH R, ESCRIBANO E, URPI-SARDA M. Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. **Pharmacological Research**, 66:375–82, 2012.

RUDGE, FELIPE; GOMIDE, GANDOLFO. Variedades de uvas. **Academia do Vinho**. 2010.

RUTHES, A. C.; RATTMANN, Y. D.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1620-1627, 2012.

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

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. TLC of Carbohydrates in M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (Ed), **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. CRC Press: Boca Raton, USA, p. 255-276, 2008a.

SASSAKI, G. L. ; SOUZA, L. M. ; SERRATO, R ; CIPRIANI, T. R. ; GORIN, P ; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography**, v. 1208, p. 215-222, 2008b.

SASSAKI, G. L.; GUERRINI, M.; SERRATO, R. V.; SANTAN FILHO, A. P.; CARLOTO, J.; SOMAS-TOSIN, F.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J. Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, p. 34-4, 2014.

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

SCHEPETKIN, I. A.; XIE, G.; KIRPOTINA, L. N.; KLEIN, R. A.; JUTILA, M. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides. **International Immunopharmacology**, vol. 8, n. 10, p. 1455-1466, 2008.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Research Clinical Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.

SIMAS-TOSIN, F. F.; ABUD, A.P.R.; DE OLIVEIRA, C.C.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L.; BUCCHI, D.F.; IACOMINI, M. Polysaccharides from peach pulp: Structure and effects on mouse peritoneal macrophages. **Food Chemistry**, 2257–2260, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, UFRGS, Florianópolis, UFSC, p. 403, 498, 2003.

SIMON, S. I.; CHERAPANOV, V.; NADRA, I.; WADDELL, T.K.; SEO, S. M.; WANG, Q.; DOERSCHUK, C. M.; DOWNEY, G.P. Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and localization with CD18. **Journal Immunology**. 163, 2891-2901, 1999.

SPURRIER, S., DOVAZ, M. *Academie du Vin, Complete Wine Course*. **G.P. Putnam & Sons**, New York.1983.

SRIVASTAVA, R.; KULSHVESHTHA, D. K. Bioactive polysaccharides from plants, **Phytochemistry**, v. 28, p. 2877-2883, 1989.

STEWART, T. S.; BALLOU, C. E. A comparison of yeast mannans and phosphomannans by actolysis. **Biochemistry**, 7: 1855-1863, 1968.

STONE, C.W.; MILLS, D.V. *Yeast products in the feed industry: a practical guide for feed professionals*. 2007. Disponível em: <[http://www.engormix.com/e\\_articles\\_view.asp?art=243&AREA=MAS](http://www.engormix.com/e_articles_view.asp?art=243&AREA=MAS)>. Acesso em: 04 nov. 2015.

SULLIVAN, C. *A Companion to California Wine: An Encyclopedia of Wine and Winemaking from the Mission Period to the Present.* **University of California Press: Berkeley.** 1998.

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

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 151-158, 2002.

TOME-CARNEIRO J, LARROSA M, YANEZ-GASCON MJ, DAVALOS A, GIL-ZAMORANO J, GONZALVEZ M, ET AL. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related micrnas and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. **Pharmacological Research**, 72:69–82, 2013.

VARKI, A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? **J. Clin Invest.**, 100, 31-35. 1997.

VIDAL, S. et al. Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: Evidence for the backbone location of the aceric acidcontaining oligoglycosyl side chain. **Carbohydrate Research**, v. 326, p. 277-294, 2000.

VIDAL, S.; WILLIAMS, P.; DOCO, T.; MOUTOUNET, M.; PELLERIN, P. The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, 54 439–447, 2003.

VINOGRADOV, E.; PETERSEN, B.; BOCK, K.; Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy at 750 MHz. **Carbohydrate Research** 307, 177-183, 1998.

VUKOVIC, R.; HUNDINA-DOMLADOVEC, M.; MRSA, V. Molecular organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Prehrambeno-Tehnology Review**, 32: (2-3) 99-102. 1994.

WAGNER, H.; JORDAN, E. An immunologically active arabinogalactan from *Viscum album* berries. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2511-2517, 1998.

WAKSHULL, E.; BRUNKE-REESE, D.; LIDERMUTH, J.; FISETTE, L.; NATHANS, R. S.; CROWLEY, J. J. TUFTS, J. C. ZIMMERMAN, J.; MACKIN, W.; ADAMS, D. S. PGG-glucan, a soluble  $\beta$ -(1,3)-glucan enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NK-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid  $\beta$ -(1,3)-glucan receptor. **Immunopharmacology**. v. 41, p. 89-107, 1999.

WANG, L.; BROWN, J.R.; VARKI, A.; ESKO J.D. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. **J Clin Invest**. 110: 127–136, 2002.

WATERS, E. J.; PELLERIN, P.; BRILLOUET, J. M. A. *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. **Carbohydrate Polymers**:23, 185-191, 1994.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 65-67, 1963a. WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

YADAV, R.; LARBI, K.Y.; YOUNG, R.E. & NOURSHARGH, S. Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. **Thrombosis Haemostasis**. 90: 598-606, 2003.

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

YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**. v. 116, n.1, p. 332-339. 2009.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. **International Immunopharmacology**, vol. 7, n. 13, p. 1639-1650, 2007.