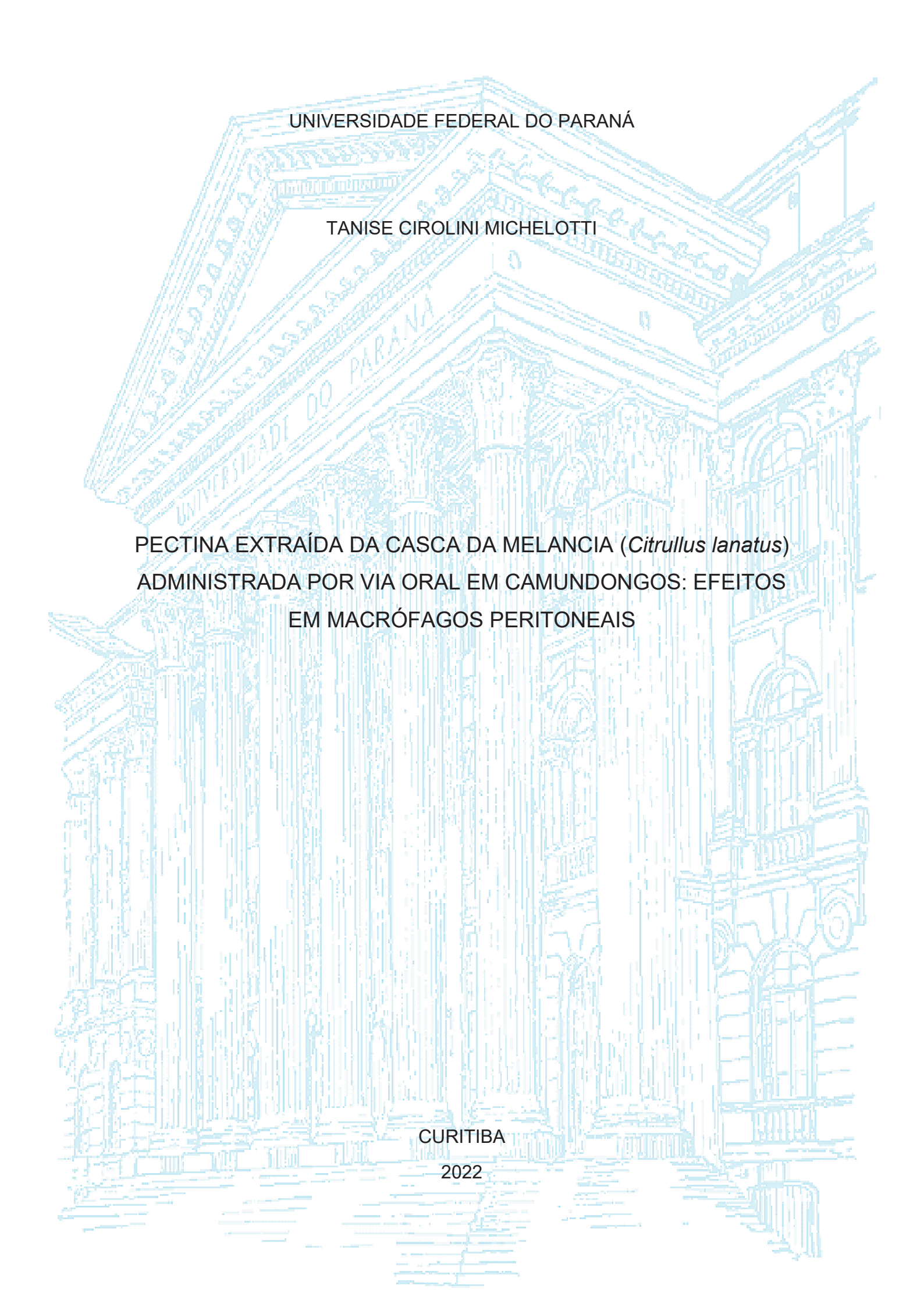




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TANISE CIROLINI MICHELOTTI

PECTINA EXTRAÍDA DA CASCA DA MELANCIA (*Citrullus lanatus*)
ADMINISTRADA POR VIA ORAL EM CAMUNDONGOS: EFEITOS
EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS

CURITIBA

2022

TANISE CIROLINI MICHELOTTI

PECTINA EXTRAÍDA DA CASCA DA MELANCIA (*Citrullus lanatus*)
ADMINISTRADA POR VIA ORAL EM CAMUNDONGOS: EFEITOS
EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências –
Bioquímica, no Curso de Pós-graduação em
Ciências – Bioquímica do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues
Noletto

Co-orientadora: Profa. Dra. Carmen Lucia de
Oliveira Petkowicz

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Michelotti, Tanise Cirolini

Pectina extraída da casca da melancia (*Citrullus lanatus*)
administrada por via oral em camundongos : efeitos em
macrófagos peritoneais / Tanise Cirolini Michelotti. – Curitiba,
2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto.

Coorientadora: Profa. Dra. Carmen Lucia de Oliveira
Petkowicz.

1. Pectina. 2. Imunomodulação. 3. Macrófagos. I. Noletto,

Guilhermina Rodrigues, 1966-. II. Petkowicz, Carmen Lúcia de

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

ATA
Nº516

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

No dia vinte e seis de setembro de dois mil e vinte e dois às 14:00 horas, na sala Anexo terceiro andar., Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Campus Centro Politécnico, Jardim das Américas., foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **TANISE CIROLINI MICHELOTTI**, intitulada: **PECTINA EXTRAÍDA DA CASCA DA MELANCIA (*Citrullus lanatus*) ADMINISTRADA POR VIA ORAL EM CAMUNDONGOS: EFEITOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS**, sob orientação da Profa. Dra. GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FABÍOLA IAGHER (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), RODRIGO VASSOLER SERRATO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 26 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

18/10/2022 18:38:55.0

GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/10/2022 11:21:28.0

FABÍOLA IAGHER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/10/2022 16:41:32.0

RODRIGO VASSOLER SERRATO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TANISE CIROLINI MICHELOTTI** intitulada: **PECTINA EXTRAÍDA DA CASCA DA MELANCIA (*Citrullus lanatus*) ADMINISTRADA POR VIA ORAL EM CAMUNDONGOS: EFEITOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS**, sob orientação da Profa. Dra. GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

18/10/2022 18:38:55.0

GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/10/2022 11:21:28.0

FABÍOLA IAGHER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/10/2022 16:41:32.0

RODRIGO VASSOLER SERRATO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 228087

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jspe> insira o código 228087

RESUMO

Polissacarídeos vegetais têm sido amplamente estudados devido aos seus expressivos efeitos imunomoduladores e baixa toxicidade. Dentre os polissacarídeos vegetais com ampla aplicabilidade, destaca-se a classe das pectinas. Foi demonstrado que pectinas podem interagir com receptores presentes na membrana de macrófagos, importantes células do sistema imune inato, e desencadear cascatas de respostas intracelulares, resultando na ativação destas células para realizar fagocitose, sintetizar e liberar mediadores, como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e diferentes citocinas – capacitando o sistema imunológico a responder de forma rápida e eficiente a uma diversidade de patógenos e reações adversas no hospedeiro. Pectinas *in natura* são fibras dietéticas e não podem ser absorvidas pelo epitélio do intestino delgado por apresentarem alta massa molecular, entretanto, quando a pectina é modificada, obtém-se um polímero de menor massa molecular e que poderia ser absorvido pelo intestino delgado, acessando a circulação e promovendo respostas imunomoduladoras. Considerando o descrito, o presente estudo avaliou o efeito do tratamento por via oral de três pectinas sobre a ativação de macrófagos de camundongos visando estabelecer uma possível relação entre estrutura e atividade biológica. Os biopolímeros utilizados foram: uma pectina extraída da casca da melancia (*Citrullus lanatus*), denominada LW, a pectina LW modificada (LWM) e uma pectina cítrica comercial modificada (MCP). Os resultados demonstraram que a modificação química por tratamento ácido e alcalino diminuiu o grau de metil esterificação (DM) e aumentou o teor de RG I da pectina nativa. Em relação aos efeitos em macrófagos peritoneais *in vitro*, apenas a LW reduziu em ~28% e ~32% a viabilidade destas células, nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, respectivamente, após 48h de incubação. Nesta condição, não houve alteração na produção de óxido nítrico por nenhuma das pectinas. Em macrófagos de animais tratados por via oral com as pectinas (200 mg/Kg), por cinco dias, foi observado aumento na atividade fagocítica. Da mesma forma, o número de macrófagos com perfil morfológico característico de ativação obtidos desses animais foi significativamente aumentado em 21,5%; 28% e 36,2% para LW, LWM e MCP, respectivamente. Não foi detectado nível significativo de óxido nítrico no fluido peritoneal dos animais tratados com as pectinas. Os resultados do presente estudo mostraram que a redução do grau de metil esterificação da pectina LW, em conjunto com o aumento de RG I, não alterou a habilidade deste polímero na ativação de macrófagos frente aos parâmetros avaliados, produção de óxido nítrico, mudanças na morfologia e na atividade fagocítica, quando administrados por via oral.

Palavras-chave: pectina, imunomodulação, macrófagos, modificação

ABSTRACT

Plant polysaccharides have been extensively studied due to their potent immunomodulatory effects and low toxicity. In fact, plant polysaccharides has varied applicability, specially pectins class. It has been shown that pectins can interact with receptors present on macrophages, important cells of the innate immune system, and trigger cascades of intracellular responses, resulting in the activation of these cells to perform phagocytosis, synthesize and release mediators, such as reactive oxygen species, nitric oxide and different cytokines – enabling the immune system to respond quickly and potently to a variety of pathogens and adverse reactions in the host. Pectins In nature are dietary fibers and cannot be absorbed by the epithelium of the small intestine, however, when pectin is modified, a lower molecular mass polymer is obtained, which can be absorbed by the epithelium of the small intestine, accessing the circulation and leading to immunomodulatory responses. The present study evaluated the effect of oral treatment of three pectins on the activation of mouse macrophages in order to establish a possible relationship between structure and biological activity. The biopolymers used were: a pectin extracted from watermelon (*Citrullus lanatus*) rind, called LW, modified LW pectin (LWM) and a modified commercial citrus pectin (MCP). The results demonstrate that the chemical modification decreased the degree of methyl esterification (DM) and increased the RG I content. Regarding the effects on peritoneal macrophages *in vitro*, only LW reduced the cell viability of these cells by ~28% and ~32% cells, at concentrations of 250 and 500 µg/mL, respectively, after 48h of incubation. In this condition, there was no change in the production of nitric oxide by any of the pectins. In macrophages from animals treated orally with pectins (200 mg/Kg) for five days, an increase in phagocytic activity was observed. Likewise, the number of macrophages with a characteristic morphological profile of activation obtained from these animals was significantly increased by 21.5%; 28% and 36.2% for LW, LWM and MCP, respectively. In the *in vitro* evaluation, in the peritoneal fluid of mice treated with pectins, there was also no stimulus for the production of nitric oxide. The results of the present study showed that the reduction in the degree of methyl esterification of LW pectin, and increased RG I, did not alter the ability of this polymer to activate macrophages in relation to the parameters evaluated, nitric oxide production, changes in morphology and phagocytic activity, when administered orally.

Keywords: pectin, immunomodulation, macrophages, modification

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por toda ajuda e todo o apoio, por investirem desde pequena em minha educação, por sempre me apoiarem e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao Diogo, por ser o melhor parceiro de vida, por sempre acreditar em mim, por sempre estar disposto a me escutar, nos piores e nos melhores momentos, e por sempre estar ao meu lado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto, pela oportunidade, pela paciência, pela dedicação e por todo o aprendizado durante esses anos de mestrado.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz, por permitir utilizar sua experiência e por todas as contribuições e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, Professor Dr. Rodrigo Vassoler Serrato e Professora Dra. Fabíola Lagher, pela disponibilidade e contribuição.

Aos colegas de trabalho, em especial a Bianca, por me ajudar em diversos momentos, contribuindo para a conclusão deste trabalho. Obrigada por toda paciência e aprendizado.

Aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná por fazerem parte do desenvolvimento de projetos dentro da universidade.

À agência financiadora CNPq, por propiciar a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1. EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL	22
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PECTINA.....	26
FIGURA 3. MECANISMO PROPOSTO PARA ABSORÇÃO DE B-GLUCANA/ PECTINA MODIFICADA.....	28
FIGURA 4. MECANISMO DE RECONHECIMENTO DE POLISSACARÍDEOS POR RECEPTORES PRESENTES NA MEMBRANA DE MACRÓFAGOS	30

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1. Effect of pectins (LW, LWM and MCP) on viability of peritoneal macrophages.....	46
Figure 2. Effect of pectins (LW, LWM and MCP) on viability of peritoneal macrophages in absorbance.	46
Figure 3. Level of nitrite in supernatant of macrophages peritoneal incubated with pectins LW, LWM and MCP.	48
Figure 4. Effect of pectins LW (A), LWM (B) and MCP (C) on NO production by macrophages from orally treated mice (200 mg/Kg) with polymers.....	49
Figure 5. Effect of pectins LW, LWM and MCP on activated macrophages and phagocytic activity from mice orally treated with polymers (200 mg/Kg).	52
Figure 6. Comparison between of pectins (LW, LWM and MCP) on activated macrophages and phagocytic activity from mice orally treated with polymers (200 mg/Kg).....	52

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Características estruturais da pectina nativa extraída da casca da melancia	34
---	----

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. Structural characteristics of pectins	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ara - Arabinose

BRM - Biological response modified

CP - Pectina cítrica

CR3 - *Complement receptor 3* (receptor do complemento 3)

DA – Grau de acetilação

Dha - Ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico

DM - Grau de metil esterificação

DP – Degree of Polymerization

FB - Pectina extraída de *Brassica oleracea* var. italica

FBS - *Fetal bovine serum* (soro fetal bovino)

FT-IR - Fourier transform-infrared

Fuc - Fucose

Gal - Galactose

Gal-3 - Galectina 3

GalA - Ácido galacturônico

GALT - Tecido linfóide associado ao intestino

GLC - Gas–liquid chromatography

Glc - Glucose

HBSS - *Hanks' Balanced Salt Solution* (solução balanceada de Hank)

HG – Homogalacturonana

HM - Alto grau de metil esterificação

IFN- γ - Interferon- γ

IL-1 - Interleucina 1

IL-12 – Interleucina 12

IL-17 - Interleucina 17

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

Kdo – Ácido 3 deoxi-mano-2- octulosônico

LM – Baixo grau de metil esterificação

LPS – Lipopolissacarídeo

LW - Pectina nativa extraída da casca da melancia

LWM - Pectina nativa modificada

Man - Manose

MCP - *Modified Citrus Pectin* (pectina modificada de *Citrus*)

MOP – Partially deacetylated and de-esterified form

MP – Pectina modificada

MR - *Mannose receptor* (receptor de manose)

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NO - *Nitric Oxide* (óxido nítrico)

OP – Acetylated pectin

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato-salino)

PRR - *Pattern Recognition Receptor* (receptor de reconhecimento de padrão)

RG-I - Ramnogalacturonana I

RG-II - Ramnogalacturonana II

Rha - Ramnose

ROS - *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)

RPMI - Meio Roswell Park Memorial Institute

SR - *Scavenger receptor* (receptor sequestrador)

TLR2 – *Toll-like receptor 2* (receptor do tipo Toll 2)

TLR-3 – *Toll-like receptor 3* (receptor do tipo Toll 3)

TLR-4 – *Toll-like receptor 4* (receptor do tipo Toll 4)

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor- α* (fator de necrose tumoral- α)

XG - Xilogalacturonana

Xyl – Xylose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	22
5 REVISÃO DE LITERATURA	23
5.1 Pectinas	23
5.1.1 Estrutura química	24
5.1.2 Mecanismo proposto para absorção intestinal de pectinas	26
5.2 Aspectos gerais dos efeitos de polissacarídeos vegetais em macrófagos	29
5.2.1 Pectinas e atividade imunomoduladora	31
5.3 Pectina de <i>Citrullus lanatus</i>	34
6 ARTIGO CIENTÍFICO	36
Abstract	36
1 Introduction	36
2. Experimental	39
2.1 <i>Modification of pectin</i>	39
2.2 <i>Determination of the monosaccharide composition of pectins</i>	39
2.3 <i>Determination of the degree of methyl-esterification (DM)</i>	39
2.4 <i>Animals</i>	40
2.5 <i>Peritoneal macrophage isolation</i>	40
2.6 <i>Measurement of the macrophages viability</i>	41
2.7 <i>Measurement of macrophage activation from mice treated with pectins orally</i>	41
2.7.1 <i>Morphological analysis</i>	41
2.7.2 <i>Phagocytic activity</i>	41
2.8 <i>Quantification of nitric oxide production</i>	42
2.9 <i>Statistical analysis</i>	42
3 Results and discussion	42
3.1 <i>Chemical composition of pectins</i>	42

3.2 Effects of LW, LWM and MCP on viability and metabolism of peritoneal macrophages	44
3.3 Effect of LW, LWM and MCP on modulation of macrophages	46
3.4 Effects of LW, LWM and MCP on morphology and phagocytic activity of peritoneal macrophages	49
4. Conclusions	53
References	54
7 CONCLUSÃO	61
8 REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes potenciais para extração de polissacarídeos, uma vez que estas biomoléculas podem ser extraídas de raízes, caules, cascas, exsudatos, folhas, frutos e sementes (CUNHA et al., 2009; LI et al., 2018). A grande variedade estrutural desses polímeros tem sido alcançada pela utilização de diferentes processos de extração a partir de vários tecidos vegetais, os quais permitem obter polissacarídeos com potencial para aplicação em diferentes áreas, como por exemplo, no desenvolvimento e formulação de fármacos (MUSA et al., 2020) e no preparo industrial de alimentos (LAURENT & BOULENGUER, 2003).

Os polissacarídeos extraídos de plantas têm sido alvo de intensas investigações por apresentarem efeitos imunomoduladores, antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórios e prebióticos (KONG et al., 2010; DORE et al., 2014; DAMMAK et al., 2019; LARSEN et al., 2019; HUANG et al., 2021; BARBOSA et al., 2021), sendo considerados modificadores da resposta biológica (MRB), e ao mesmo tempo, baixo potencial para efeitos colaterais significativos (YIN et al., 2019; SCHEPETKIN & QUINN, 2006).

Dentre os polissacarídeos vegetais com extensa aplicabilidade, destaca-se a classe das pectinas. Esses polímeros estão presentes na parede celular de frutas e verduras, incluindo maçã, melancia, mamão, brócolis e frutas cítricas (PETKOWICZ et al., 2017; BEUKEMA et al., 2020; PRADO et al., 2020; BUSATO et al., 2020). Pectinas ingeridas de forma natural exercem seus efeitos como fibra alimentar, uma vez que os polímeros *in natura* não são degradados por enzimas presentes no trato gastrointestinal superior, sendo fermentados por bactérias presentes no intestino grosso (HOLLOWAY et al., 1983; NITURE & REFAI, 2013; ELIAZ & RAZ, 2019; LARSEN et al., 2019), e este aspecto não será aprofundado nesta dissertação.

Os estudos com pectinas, principalmente *in vitro*, visando investigação dos seus efeitos como MRB, têm revelado que a atividade biológica das pectinas está intimamente ligada a parâmetros estruturais (AMORIM et al., 2016; TIAN et al., 2016; ZHAO et al., 2017; PARK et al., 2019). Os efeitos antitumorais e imunomoduladores são os mais estudados para as pectinas. Foi demonstrado

que esses biopolímeros podem regular o sistema imunológico por meio da ativação de células do sistema imune inato e adaptativo (PARK et al., 2019; PRADO et al., 2020; BUSATO et al., 2020; HUANG et al., 2021). A maioria desses estudos concentram-se em macrófagos, importantes células do sistema imune inato (GORDON, 1998). Pectinas podem não somente aumentar a atividade fagocítica de macrófagos, mas também aumentar a produção de óxido nítrico e a liberação de citocinas inflamatórias, auxiliando na capacidade do hospedeiro em responder rapidamente a patógenos (SCHEPETKIN & QUINN et al., 2006; YIN et al., 2019; HUANG et al., 2021). Posto isso, sugere-se que as pectinas podem tornar-se alvos promissores na melhora do sistema imunológico do hospedeiro.

A evidente limitação da internalização de pectinas por meio da absorção intestinal (HOLLOWAY et al., 1983; LECRERE et al., 2013; NITURE & REFAI, 2013; ELIAZ & RAZ, 2019; LARSEN et al., 2019) e o seu expressivo potencial MRB demonstrado por estudos *in vitro* (GAVLIGHI et al., 2018; AMORIM et al., 2016; PARK et al., 2019) conduziram para o desenvolvimento de protocolos para a produção de pectinas modificadas – polímeros com menor massa molecular, ricos em galactose e com reduzido grau de metil esterificação, que pode favorecer a sua internalização pelo epitélio do intestino delgado e alcançar a circulação (COURTS et al., 2013; ELIAZ & RAZ, 2019). A maioria dos estudos com pectinas modificadas foram realizados com pectina cítrica modificada (MCP), que é disponível comercialmente. Foi demonstrado que a MCP, administrada oralmente em camundongos, exerceu um potente efeito na inibição de metástase em células tumorais (PIENTA et al., 1995; HAYASHI et al., 2000; NANGIA, 2002). Ademais, já foi evidenciado aumento na produção de citocinas do baço e ativação de macrófagos e de linfócitos *in vivo* após administração oral com MCP (MERHEB et al., 2019) e com pectina nativa – não modificada (BUSATO et al., 2020), no entanto, ainda há necessidade de investigações para compreensão de como ocorrem esses efeitos.

Como exemplificado no caso da MCP, polissacarídeos nativos podem ser modificados por processos químicos e/ou enzimáticos, resultando em moléculas com estrutura e atividade biológica diferenciada. Estudos comparativos entre os biopolímeros nativos e modificados são extremamente úteis para estabelecer

relações estrutura e atividade biológica, as quais por sua vez são, geralmente, indispensáveis para a compreensão dos mecanismos envolvidos.

Considerando o descrito, o presente estudo avaliou o efeito do tratamento por via oral de três pectinas sobre a ativação de macrófagos de camundongos, visando estabelecer uma possível relação entre estrutura e atividade biológica. Os biopolímeros utilizados foram: uma pectina extraída da casca da melancia (*Citrullus lanatus*), denominada LW, já previamente caracterizada, a pectina LW modificada (LWM) e uma pectina cítrica comercial modificada (MCP).

2 JUSTIFICATIVA

Os estudos com pectinas têm revelado que essa classe de polissacarídeos possui um amplo espectro de investigação no que se refere a relação estrutura-atividade (AMORIM et al., 2016; ZHAO et al., 2017; PARK et al., 2019). Entretanto, uma revisão de Guo et al. (2022) mostrou que dos 373 estudos que avaliaram a atividade imunomoduladora de pectinas, apenas 105 relacionaram com suas características estruturais, demonstrando a necessidade de mais estudos acerca da relação estrutura e atividade biológica de pectinas. Além disso, os efeitos das pectinas sobre a modulação do sistema imune e células tumorais (PELLEY & STRICKLAND., 2000; CHAN et al., 2009; POPOV et al., 2013; HOU et al., 2020) têm motivado a busca por novas moléculas objetivando ampliar a disponibilidade de preparações dessas biomoléculas para uso como medicamentos.

Um aspecto importante a considerar nos estudos das pectinas é seu material de obtenção, uma vez que esses biopolímeros podem ser extraídos de diversas fontes como resíduos que normalmente são descartados provenientes da preparação de alimentos ou de cascas de frutas (AL-SAYED & AHMED, 2013; SALEEM et al., 2020). Nos últimos anos, o aproveitamento de resíduos vegetais tem despertado grande interesse por contribuir para um destino adequado de muitos tipos de “sobras” (KUMAR et al., 2020). Neste sentido, a casca da melancia representa cerca de 30% do fruto inteiro, e embora seja comestível, não é comumente consumida como alimento, resultando em grande volume de material descartado (AL-SAYED & AHMED, 2013; HO et al., 2016). Encontrar uma aplicabilidade para o uso desses resíduos pode ser uma possibilidade economicamente interessante.

Considerando as atividades imunomoduladoras exercidas por pectinas, a ausência de estudos de atividade biológica com a pectina extraída da casca da melancia, acrescido da possibilidade de encontrar um destino para o uso do resíduo de casca de melancia, este trabalho teve como objetivo principal investigar o potencial imunomodulador das pectinas extraídas da casca da melancia (nativa e quimicamente modificada) e comparar com uma pectina cítrica comercial modificada (MCP) em camundongos tratados por via oral com

os polímeros. Além disto, uma vez que a pectina da casca da melancia na sua forma nativa (LW) foi previamente extraída e caracterizada por Petkowicz et al. (2017), a sua modificação, originando a pectina modificada (LWM), buscou ampliar os conhecimentos acerca da relação estrutura-atividade, bem como compará-las com uma pectina cítrica comercial modificada (MCP), a qual é amplamente estudada em células tumorais (PIENTA et al., 1995; NANGIA et al., 2002; HOSSEIN et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a resposta de macrófagos peritoneais de camundongos e a relação entre estrutura e atividade biológica de três pectinas: uma pectina extraída da casca da melancia (*Citrullus lanatus*) na sua forma nativa (LW) e modificada (LWM) e uma pectina cítrica comercial modificada (MCP).

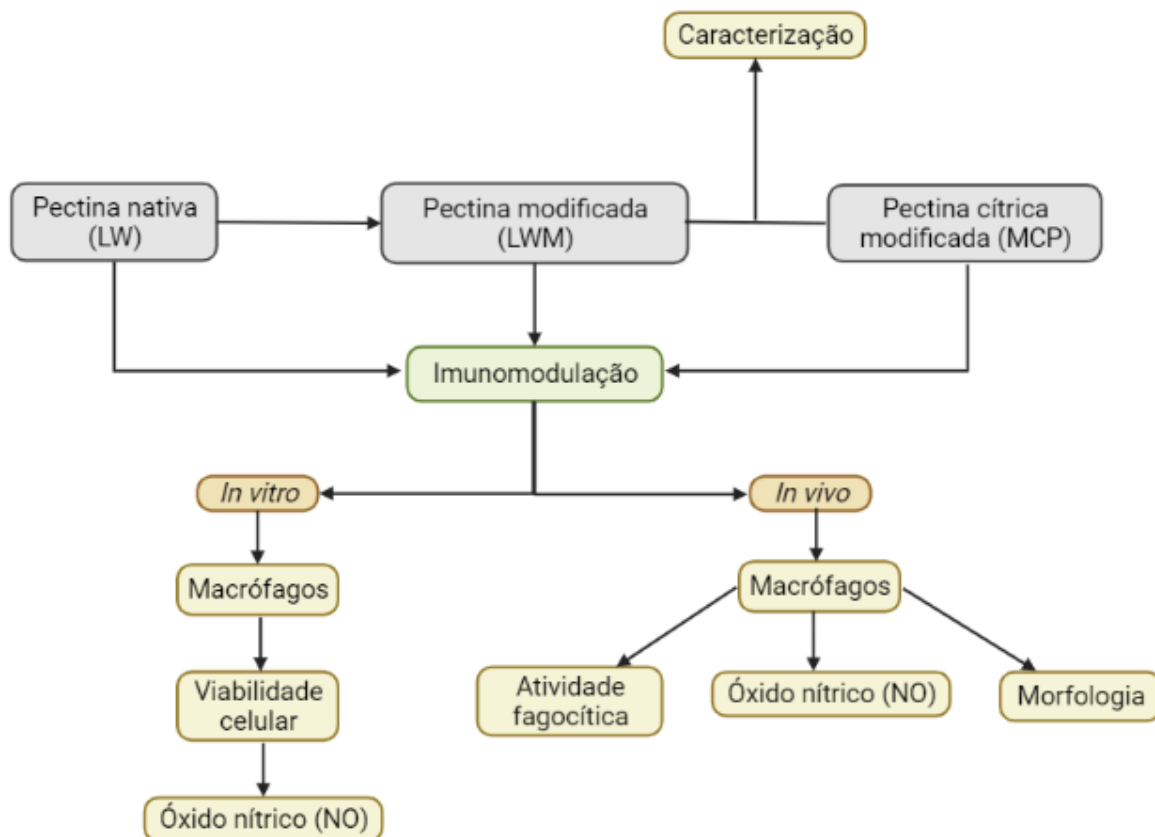
3.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo proposto foram estabelecidos os objetivos específicos a seguir:

- Modificar quimicamente uma pectina extraída da casca da melancia (*Citrullus lanatus*)
- Caracterizar a pectina extraída da casca da melancia na sua forma modificada (LWM) e uma pectina cítrica comercial modificada (MCP);
- Avaliar a citotoxicidade das pectinas em macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*;
- Avaliar os efeitos das pectinas na produção de óxido nítrico após incubação com as pectinas *in vitro*;
- Avaliar o efeito das pectinas sobre a morfologia, atividade fagocítica e produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais de camundongos tratados oralmente com as três pectinas.

4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

FIGURA 1. EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL



Nota: A pectina nativa (LW) foi previamente extraída da casca da melancia e caracterizada e sua modificação química objetivou ampliar os conhecimentos acerca da relação estrutura-atividade. A pectina modificada (LWM) e a pectina cítrica modificada (MCP) foram caracterizadas e as três pectinas foram avaliadas sobre a sua atividade imunomoduladora. Para os ensaios *in vitro*, foi avaliado a viabilidade celular e a produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais de camundongos. Para os ensaios *in vivo*, foi avaliada a atividade fagocítica, a produção de óxido nítrico e a morfologia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados oralmente com os polímeros.

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Pectinas

As pectinas foram descobertas, enquanto composto químico, por Vauquelin em 1790 e Braconnot, em 1824, a caracterizou como composto das frutas responsável pela formação de gel e sugeriu o nome pectina, originário de uma palavra grega que significa “congelar ou solidificar” (NUSSINOVITCH, 1997; CANTERI et al., 2012).

As pectinas são componentes estruturais da parede celular vegetal e fazem naturalmente parte da dieta humana (MAXWELL et al., 2012; CANTERI et al., 2012). O teor de pectina varia de acordo com o material vegetal, sendo presente em alta concentração na casca de frutas cítricas, como limão e laranja (15-20% do material seco) e no bagaço da maçã (10-15% do material seco) (THAKUR et al., 1997), que são utilizados para produção industrial de pectinas. Entretanto, há um crescente interesse por caracterizar novas fontes de pectinas e diferentes resíduos vegetais vêm sendo investigados para este fim, incluindo cascas de melancia, cascas de manga e talos de brócolis (PETKOWICZ et al., 2017; BUSATO et al., 2020; WONGKAEW et al., 2021).

A principal utilização de pectinas comerciais é como agente gelificante, sendo responsável pela consistência gelatinosa de geleias e compotas (THAKUR et al., 1997; VORAGEN et al., 2009; BAGAL et al., 2019). Também são utilizadas como estabilizante, por exemplo, em leites fermentados e como material de revestimento na liberação de fármacos (WILLATS et al., 2006; MUSA et al., 2020). Ademais, as pectinas vêm sendo amplamente estudadas devido a seus potentes efeitos biológicos (KONG et al., 2010; DORE et al., 2014; DAMMAK et al., 2019), os quais serão discutidos posteriormente nesta dissertação.

As propriedades das pectinas são dependentes de seus parâmetros estruturais (POPOV et al., 2013; WILLATS et al., 2016). Assim, a possibilidade de aplicação em alimentos ou produtos farmacêuticos, bem como seus efeitos biológicos, está relacionado às características estruturais dos polímeros. (WILLATS et al., 2006).

5.1.1 Estrutura química

As pectinas são heteropolissacarídeos ricos em ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas α -(1→4). Há quatro tipos de polissacarídeos principais, identificados como homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG I), ramnogalacturonana II (RG II) e xilogalacturonana (XG), sendo que, HG e RG I são os principais componentes (MAXWELL et al., 2012; WILLATS et al., 2016).

HG é o polissacarídeo mais abundante nas pectinas, podendo representar até 65% do total de pectinas e consiste em uma cadeia de unidades de ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas α -(1→4) (MOHNEN, 2008). O grupo carboxila das unidades de ácido galacturônico pode estar metil esterificado no C-6 e as hidroxilas podem estar O-acetiladas no C-3 e/ou C-2, a depender da fonte vegetal. O percentual de ácidos carboxílicos metil esterificados em relação ao total de ácidos carboxílicos nas pectinas é denominado de grau de esterificação ou grau de metil esterificação (DM). Quando esse percentual é igual ou superior a 50%, a pectina é considerada de alto grau de metil esterificação (HM) e quando é menor que 50%, a pectina é considerada de baixo grau de metil esterificação (LM). A proporção de grupos O-acetil em relação ao total de unidades de ácido galacturônico é denominada de grau de acetilação (DA). Normalmente, as pectinas nativas apresentam alto grau de metil esterificação e baixo grau de acetilação (VORAGEN et al., 1995; MOHNEN et al., 2008; VORAGEN et al., 2009; MAXWELL et al., 2012; WILLATS et al., 2016).

RG I é o segundo polissacarídeo mais abundante nas pectinas, podendo representar até 25% do total de pectinas, e apresenta uma cadeia principal constituída por unidades alternadas de ramnose e ácido galacturônico. A ramnose se liga às unidades de ácido galacturônico por ligações α -(1→4) e o ácido galacturônico se liga às unidades de ramnose por ligações α -(1→2). Aproximadamente 25-80% das unidades de ramnose são substituídas na posição O-4 por cadeias laterais neutras constituídas por arabinose (arabinanas) ou por galactose (galactanas) ou por uma mistura de arabinose e galactose (arabinogalactanas). As unidades de arabinose são unidas por ligações α -(1→5), sendo que algumas unidades são substituídas na posição O-3 e/ou O-2 por

unidades de arabinose ligadas α -(1→5); e as unidades de galactose são unidas por ligações β -(1→4) (VORAGEN et al, 1995; MOHNEN et al., 2008; YAPO, 2011; MAXWELL et al., 2012; WILLATS et al., 2016).

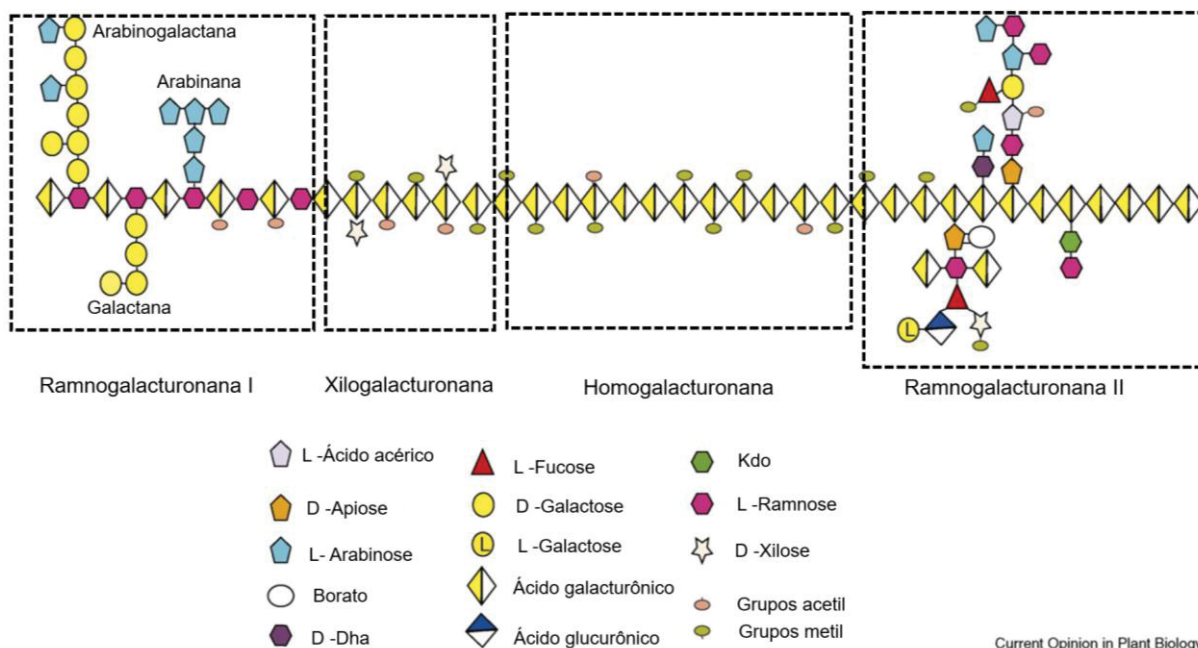
As arabinogalactanas ocorrem em duas formas estruturalmente diferentes. As arabinogalactanas do tipo I têm uma cadeia linear de unidades de galactose ligadas β -(1→4), substituídas na posição O-3 por unidades de arabinose ligadas α -(1→5). Nas arabinogalactanas do tipo II, as unidades de galactose são unidas por ligações β -(1→3) e β -(1→6), substituídas na posição O-3 e O-6 por unidades terminais de arabinose, contudo, outros monossacarídeos também podem aparecer como unidades terminais. Além disso, as arabinogalactanas do tipo II geralmente estão associadas às proteínas e, nesse caso, também são denominadas de arabinogalactanas-proteínas (AGPs) (VORAGEN et al, 1995; MOHNEN et al., 2008; YAPO, 2011; MAXWELL et al., 2012; WILLATS et al., 2016; BEUKEMA et al, 2020).

RG II representa no máximo 10% do total de pectinas e é considerado o polissacarídeo mais complexo das plantas, consistindo em uma cadeia principal de ácido galacturônico (9 a 11 unidades) ligados α -(1→4). Esse polissacarídeo apresenta 13 tipos diferentes de monossacarídeos (incluindo açúcares raros como apiose, ácido acérico, Dha e Kdo) e 21 tipos de ligações glicosídicas (THAKUR et al., 1997; VORAGEN et al., 2009; WILLATS et al., 2016; BEUKEMA et al., 2020).

A xilogalacturonana é um representante das galacturonanas substituídas, que apresenta uma cadeia de ácido galacturônico substituída por unidades de xilose, as quais estão ligadas a cadeia principal por ligações β -(1→3) (BEUKEMA et al., 2020).

A representação esquemática da estrutura dos quatro tipos de polissacarídeos principais das pectinas pode ser visualizada na Figura 2.

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PECTINA



Legenda: D-Dha = ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico; Kdo = ácido 3 deoxi-mano-2-octulosônico.

FONTE: adaptado de Mohen (2008).

5.1.2 Mecanismo proposto para absorção intestinal de pectinas

Na ação como fibra alimentar, as pectinas apresentam vários efeitos benéficos ao hospedeiro, como por exemplo, redução nos níveis de colesterol plasmático e diminuição da resposta glicêmica (JENKINS et al., 1977; BROUNS et al., 2012).

Embora as pectinas nativas não sejam degradadas por enzimas presentes no trato gastrointestinal superior, podem ser fragmentadas por bactérias presentes no intestino grosso, culminando na produção de ácidos graxos de cadeia curta e outros metabólicos (HOLLOWAY et al., 1985; UKUNAGA et al., 2003; ZHU et al., 2022). Em estudos com camundongos tratados com pectinas foi observado aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta, produtos da fermentação bacteriana (FUKUNAGA et al., 2002; SONG et al., 2022). Adicionalmente, Knaup et al. (2008) mostraram que um

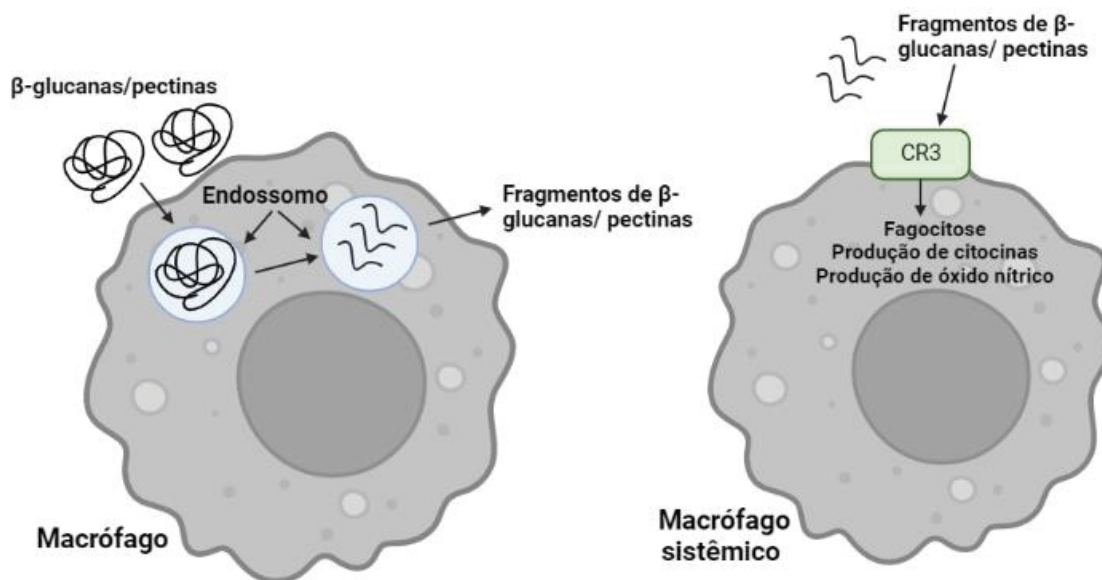
monômero de ácido galacturônico foi estável na saliva e em modelo de suco gástrico simulado, sendo decomposto por fermentação bacteriana ao atingir o cólon.

Os resultados acima ainda são corroborados por estudos que demonstraram que pectinas podem ser adequadas para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos cólon específico. As pectinas podem ser aplicadas nesses sistemas porque resistem à degradação enzimática, permitindo com que o fármaco seja liberado apenas no cólon (WONG et al., 2011; MUSA et al., 2020).

Portanto, é evidente que a maior parte da pectina ingerida não é degradada por enzimas presentes no trato gastrointestinal superior e para tentar viabilizar a absorção de pectinas, há pesquisas investigando o efeito de pectinas modificadas (MP) quando administradas por via oral. A MP foi hidrolisada em fragmentos com menor massa molecular e poderia ser absorvida pelo intestino delgado (MAXWELL et al., 2012). A maioria dos estudos avaliando os efeitos sistêmicos a partir de sua administração gastrointestinal são realizados com pectinas modificadas obtidas de fontes cítricas (MCPs) (LECLERE et al., 2016; RAMACHANDRAN et al., 2017; OGUTU et al., 2018). Ainda não há clareza sobre o mecanismo de absorção de pectinas, no entanto, diante dos evidentes efeitos sistêmicos com similaridade aos observados para as β -glucanas, foi sugerido que as pectinas modificadas podem ser absorvidas de forma análoga ao proposto para as β -glucanas (CHAN et al., 2009; MAXWELL et al., 2012; MORRIS et al., 2013). Similar às pectinas, as β -glucanas são carboidratos não digeríveis, cujos efeitos imunomoduladores após a sua administração oral já foram comprovados (SUZUKI et al., 1989; SANDVIK et al., 2007). Sugere-se que as β -glucanas possam ser internalizadas por células epiteliais intestinais e células do tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Uma vez internalizadas, os polímeros são captados por macrófagos associados ao GALT, sendo estes transportados pelo sistema retículo endotelial para acessar a corrente sanguínea. No interior dos macrófagos, ocorre a fragmentação das β -glucanas, as quais são liberadas na circulação e podem ativar os macrófagos de diversas maneiras, como por exemplo, pela interação com o receptor 3 do complemento (CR3), desencadeando os efeitos sistêmicos observados (CHAN et al., 2009; MAXWELL et al., 2012; MORRIS et al., 2013). Em estudos com pectinas, os

resultados mostram efeitos sistêmicos compatíveis com a presença destas moléculas na corrente sanguínea, assim como ocorre ao inferido para as β -glucanas. Suh et al. (2013) observaram que a administração oral de uma pectina, que aparentava características químicas semelhantes a MCP, aumentou a proliferação de células medula óssea em camundongos, por contribuir para secreção de fatores de crescimento hematopoiético das células de Peyer. Em concordância, Sakurai et al. (1999) demonstraram que uma pectina administrada oralmente em camundongos foi detectada nas placas de Peyer do GALT usando anticorpo antipolissacarídeo. Segundo Morris et al. (2013), a modificação das pectinas facilita a absorção, todavia, o modo de absorção ainda não está claro e não se sabe se as estruturas presentes na pectina modificada são as unidades ativas, ou se outras modificações ocorrem após o consumo oral. Dessa forma, o mecanismo de absorção permanece incerto e mais estudos são necessários para esclarecê-lo.

FIGURA 3. MECANISMO PROPOSTO PARA ABSORÇÃO DE B-GLUCANA/ PECTINA MODIFICADA



Nota: As β -glucanas/pectinas modificadas absorvidas pelo trato gastrointestinal interagem com receptores presentes em macrófagos, sendo capturadas, degradadas e liberadas para circulação. Os fragmentos de β -glucanas/pectinas modificadas na circulação podem interagir com receptores (CR3) presentes em macrófagos e desencadear as respostas imunomoduladoras sistêmicas, como aumento de fagocitose, citocinas e óxido nítrico.

FONTE: Autor, adaptada de Morris et al. (2013).

5.2 Aspectos gerais dos efeitos de polissacarídeos vegetais em macrófagos

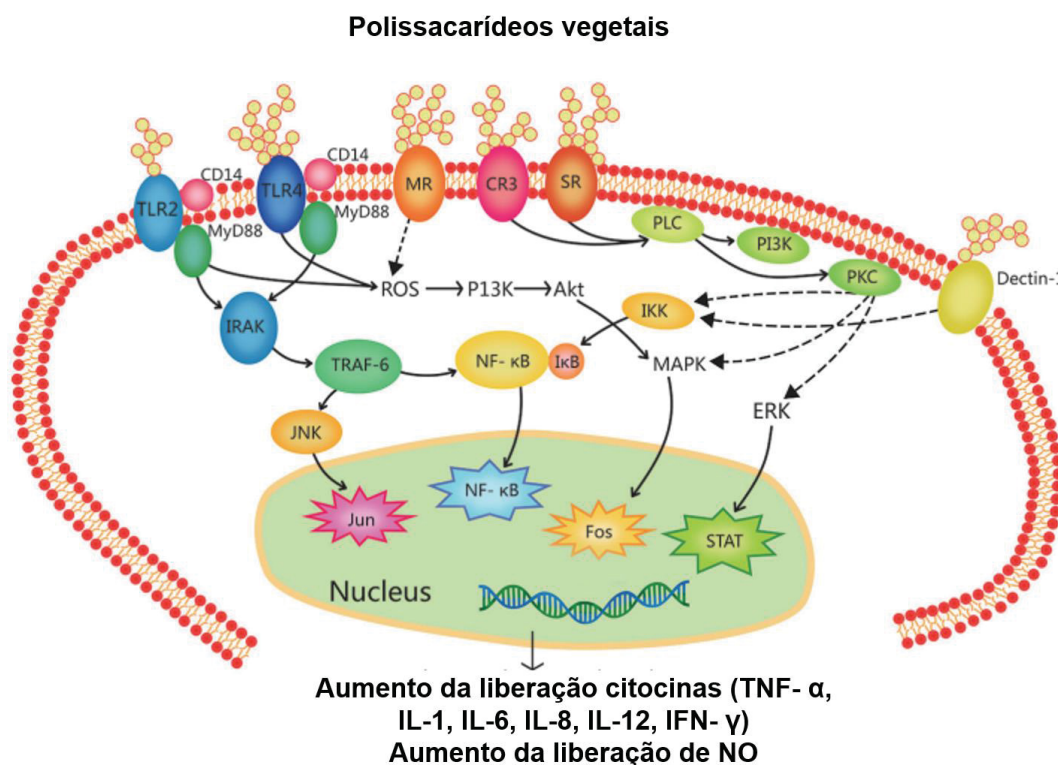
A maioria dos estudos com polissacarídeos vegetais visando investigar sua ação sobre o sistema imunológico são realizados com macrófagos (MERHEB et al., 2019; PARK et al., 2019; ZHU et al., 2020; HUANG et al., 2021). Essas células estão distribuídas por todo o corpo e junto com os neutrófilos são as primeiras células a responderem a uma invasão por patógenos, e fazem parte da resposta imune inata. Os macrófagos também atuam como células apresentadoras de antígenos, interagindo com linfócitos T no desencadeamento da resposta imune adaptativa (BEUTLER, 2004; SCHEPETKIN & QUINN, 2005; HIRAYAMA et al., 2017). A grande plasticidade dos macrófagos se deve à ampla variedade de receptores expressos na sua membrana, que são capazes de reconhecer e ligar uma grande diversidade de moléculas (ligantes), como certos tipos de polissacarídeos (SCHEPETKIN, QUINN, 2005; YIN et al., 2019).

Os receptores conhecidos por interagir com polissacarídeos pertencem a classe dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Esses receptores reconhecem padrões moleculares, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), que estão presentes na superfície de muitos micróbios, iniciando uma resposta imune apropriada para defender o hospedeiro (AMARANTE et al., 2018; LI & WU, 2021). Especificamente, os polissacarídeos podem se ligar aos macrófagos por meio do receptor *toll-like* 4 (TLR4), receptor *toll-like* 2 (TLR2), CD14, receptor 3 do complemento (CR3), receptor *scavenger* (SR), receptor de manose (MR) e dectina-1 (Figura 4) (SCHEPETKIN & QUINN, 2005; YIN et al., 2019).

Como demonstrado na Figura 4, após a interação dos polissacarídeos com o receptor, os macrófagos respondem ativando vias de sinalização que culminam na alteração de seu fenótipo para um perfil ativado. A ativação de macrófagos pode ser evidenciada por alteração na sua morfologia, aumento da capacidade fagocítica, síntese e secreção de mediadores como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), produção de citocinas (ex. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ) etc., que atuam em conjunto para combater patógenos e regular o sistema imune (SCHEPETKIN & QUINN, 2005; YIN et al., 2019). Dessa forma, a modulação da imunidade pela ativação de macrófagos

pode ter um impacto significativo na capacidade do hospedeiro em responder de forma rápida e potente a uma diversidade de patógenos.

FIGURA 4. MECANISMO DE RECONHECIMENTO DE POLISSACARÍDEOS POR RECEPTORES PRESENTES NA MEMBRANA DE MACRÓFAGOS



Nota: As ligações de polissacarídeos vegetais a receptores presentes na membrana macrófagos (TLR4, TLR2, CD14, CR3, SR, MR e dectina-1) desencadeia uma cascata de sinalizações intracelulares, as quais ativam proteínas como JNK e NF- κ B, resultando no aumento da produção de NO e de citocinas.

Fonte: adaptada de Yin et al. (2019)

Nesta perspectiva, vários estudos mostram a capacidade de polissacarídeos ativarem macrófagos, *in vitro*, por meio de sua ligação a receptores. Ando et al. (2002) demonstraram que dois polissacarídeos extraídos de pétalas secas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), compostos por ramnose (2,9%), arabinose (7,5% e 10,3%), xilose (3,8% e 4,2%), glucose (11,6% e 5,1%) e galactose (8,9% e 8,5%), ativaram macrófagos via TLR4, resultando na produção de TNF- α e NO. Além disso, essa resposta estava ausente em

macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ que possuem uma mutação pontual no gene TLR4. Os polissacarídeos extraídos da casca da tangerina (*Citrus unshiu*) estimularam a produção de IL-6, TNF- α e NO em macrófagos RAW 264.7 via TLR2 e TLR4 (SHIN et al., 2018). O receptor CD14 também demonstrou participar da resposta a polissacarídeo vegetal, anticorpos anti-CD14 diminuíram a produção de NO de macrófagos induzido por polissacarídeos extraídos de *Platycodon grandiflorum* (HAN et al., 2021). Ademais, foi demonstrado que uma pectina composta principalmente por ácido galacturônico ativou macrófagos via TLR4 e CR3 (HUANG et al., 2021).

5.2.1 Pectinas e atividade imunomoduladora

Considerando que a interação de receptores da membrana de macrófagos com os polissacarídeos é estereoespecífica (CHEN et al., 2022), é previsível que a atividade biológica dos polissacarídeos esteja relacionada com a sua estrutura (POPOV et al., 2013; ZHAO et al., 2017; LARSEN et al., 2019). Nesse sentido, a relação entre estrutura e efeitos imunomoduladores de polissacarídeos pécnicos têm sido amplamente estudada (PARK et al., 2017; MINZANOVA et al., 2018; GAO et al., 2019; BUSATO et al., 2020).

No estudo de Huang et al. (2021), os autores demonstraram que um polissacarídeo pécnico extraído da abóbora (*Cucurbita moschata*) ativou macrófagos, *in vitro*, via interação com receptor *toll-like* 4 (TLR4) e CR3, desencadeando aumento da atividade fagocítica, da produção de óxido nítrico e de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β). Esse polissacarídeo apresentava grandes quantidades de ácido galacturônico e baixas quantidades de ramnose, galactose e arabinose, com 89,4% de DM; 3,2% de DA e peso molecular de 31,97 kDa. Park et al. (2019) avaliaram a atividade imunomoduladora *in vitro* de um polissacarídeo pécnico, denominado CCE-I, o qual apresentou peso molecular de 62 kDa e era constituído principalmente por ácido galacturônico (41%), ramnose (19,5%), galactose (18,5%) e arabinose (8,1%). Os autores concluíram que o CCE-I era um polissacarídeo RG-I com cadeias curtas e ramificadas de arabinana e galactana. O polissacarídeo foi reconhecido por interagir com TLR2,

TLR4 e SR presente na membrana de macrófagos, aumentando a produção de NO e de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-12).

Semelhantemente, foi avaliada a atividade imunomoduladora de três polissacarídeos pécticos (AMAP-1, AMAP-2, AMAP-2) extraídos da *Atractylodis macrocephalae rhizoma*. Os resultados indicaram que AMAP-1 e AMAP-2 apresentaram quantidades maiores de galactose (27% e 9,5%) e arabinose (18,4% e 23,5%) e menores quantidades de ácido galacturônico (44,6% e 54,1%) em comparação a AMAP-3 (4,2% de galactose; 6,8% de arabinose; 78% de ácido galacturônico). AMAP-1 e AMAP-2 promoveram aumento significativo na produção de NO por macrófagos, enquanto AMAP-3 não foi capaz de promover aumento na produção de NO, sugerindo que essa atividade imunomoduladora pode estar relacionada às cadeias laterais de RG I (CUI et al., 2020). Popov & Ovodov (2013) também sugerem que as cadeiras laterais de RG I das pectinas desempenham um papel importante na estimulação da resposta imune por macrófagos.

Em concordância com o descrito acima, outras evidências demonstram que as cadeias laterais de RG I podem ser as principais responsáveis pelos efeitos imunomoduladores observados nas pectinas. Ho et al. (2015) concluíram que as cadeias laterais de arabinogalactanas, ligadas à região RG I, são importantes para a atividade imunomoduladora de macrófagos, evidenciada por um aumento na produção de NO. Na revisão de Guo et al. (2022) é sugerido que as cadeias laterais de galactanas contribuem para as atividades imunomoduladoras e/ou antitumorais, enquanto as cadeias laterais de arabinogalactanas foram relatadas como as principais responsáveis pela estimulação da produção de NO. Também foi demonstrado que dois polissacarídeos pécticos altamente metil esterificados (90,8% e 93,7%) com longas regiões de homogalacturonana interrompidas por uma região curta de RG I foram capazes de aumentar a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW264.7 (SUN et al., 2019). Portanto, embora haja um forte campo de evidências sugerindo que RG I seja a principal responsável pelos efeitos imunomoduladores exercidos pelas pectinas, como aumento na produção de NO e de citocinas, as regiões de homogalacturonanas também podem exercer um importante papel.

Foi avaliada a atividade imunomoduladora de uma pectina extraída das cascas de vagens de cacau na sua forma nativa (OP) e na sua forma modificada (MOP). Foi demonstrado que a pectina parcialmente desacetilada e desesterificada (MOP), com 20,8% de DM e 9,4% de DA, foi capaz de aumentar o número de macrófagos morfológicamente ativados e a produção de NO *in vitro*, mas tal efeito não foi observado com a pectina nativa (OP), com 56,6% de DM e 17,1% de DA. Além disso, MOP apresentou maior teor de galactose (19,7%) e ramnose (18%) em comparação a OP (16,8% de galactose e 10% de ramnose). Esses resultados corroboram a premissa de que as modificações químicas dos biopolímeros podem resultar em um produto aprimorado com novas possibilidades de aplicação (AMORIM et al., 2016).

Os efeitos de pectinas no sistema imune são em sua maioria realizados por meio de estudos *in vitro*. Entretanto, é possível que tais efeitos possam ser ineficazes ou diferentes quando as pectinas são administradas por via oral (RAMBERG et al., 2010). Nesse sentido, Merheb et al. (2019) avaliaram os efeitos de duas pectinas administradas oralmente em camundongos, pectina cítrica (CP) e pectina cítrica modificada (MCP). Os resultados demonstraram que a CP e em especial a MCP apresentaram efeitos imunomoduladores sobre os níveis de citocinas do baço (TNF- α , IFN- γ e IL-17). Semelhantemente, foi observado que a administração oral em camundongos de uma pectina nativa extraída de talos do brócolis foi eficaz em modular células do sistema imune, aumentando o número de macrófagos morfológicamente ativados, a capacidade fagocítica e a produção de IL-10 (BUSATO et al., 2020). Jie et al. (2020) demonstraram que um polissacarídeo constituído por cadeias curtas de β -(1,4)-D-glucana e pectina RG I, isolados de *Ma-Nuo-Xi Decoction*, aumentou a atividade fagocítica de macrófagos a partir de camundongos tratados oralmente com o polímero.

A vasta literatura sobre os efeitos das pectinas na modulação do sistema imune demonstra que estes biopolímeros podem ativar células imunológicas e potencializar a resposta imune do hospedeiro, sem apresentarem efeitos colaterais e com boa segurança (CUI et al., 2020). As diferenças estruturais podem resultar em propriedades imunomoduladoras distintas. Entretanto, para aplicações clínicas seguras, pesquisas ainda são necessárias para confirmar a

atividade imune *in vivo* e determinar os mecanismos pelos quais as pectinas afetam os macrófagos (MINZANOVA et al., 2018).

5.3 Pectina de *Citrullus lanatus*

A melancia (*Citrullus lanatus*) é nativa da África (BELKHEIRI et al., 2021) e apresenta uma produção mundial média de 97 milhões de toneladas por ano (FAO, 2021). A polpa presente no interior da melancia é comestível, doce e utilizada para sucos e saladas (REDDY et al., 2018). A casca da melancia representa cerca de 30% da massa total do fruto e normalmente costuma ser descartada, apesar de ser comestível (SAYED & AHMED, 2013). A casca da melancia contém celulose, pectinas, proteínas, citrulina e carotenoides (RIMANDO & VEAZIE, 2005; QHEK et al., 2007; MORT et al., 2008).

Cascas de melancia secas foram utilizadas para extração de pectina por Petkowicz et al. (2017). A pectina, denominada LW, apresentou 68,7% de GalA, 2,9% de Rha e Gal como principal monossacarídeo neutro (22,6%). O grau de metil esterificação foi de 65% e a massa molar foi de 4.039×10^4 g/mol.

Tabela 1. Características estruturais da pectina nativa extraída da casca da melancia

	LW
Composição de monossacarídeos (%)	
GalA	68,7
Rha	2,9
Fuc	0,1
Ara	0,6
Xyl	0,5
Man	0,6
Gal	22,6
Glc	4,0
Características estruturais	
HG	65,8
RG-I	29,0
(Ara + Gal)/Rha	8,0
DM	61,5

Fonte: Petkowicz et al. (2017).

Embora existam outros trabalhos avaliando a extração da pectina da melancia (CAMPBELL, 2006; JIANG et al., 2012; HARTATI et al., 2014; ROMDHANE et al., 2017; SARI et al., 2018), não foram encontrados estudos relacionados a atividade imunomoduladora das pectinas da casca. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado efeitos benéficos da casca da melancia, como atividade antioxidante (AL-SAYED et al., 2013; HONG et al., 2014; NEGLO et al., 2021), antimicrobiana (NEGLO et al., 2021) e antitumoral (DAMMAK et al., 2019).

Nesse sentido, um polissacarídeo péctico extraído da casca da melancia, denominado PWR, demonstrou citototoxicidade contra células Hep-2 (DAMMAK et al., 2019). A atividade antioxidante e antimicrobiana também foi avaliada. Neglo et al. (2021) realizaram uma avaliação comparativa de extratos de diversas partes do fruto da melancia (casca, polpa e semente) sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana. Foi demonstrado que a casca apresentou a maior capacidade antioxidante e antimicrobiana, sendo que a atividade antimicrobiana ficou próxima ao controle positivo (cloranfenicol), que é um antibiótico de amplo espectro. Resultados semelhantes foram encontrados por Asghar et al. (2013) no qual o extrato da casca da melancia apresentou potencial na eliminação de radicais livres. Além disso, foi avaliado o efeito da melancia em pó em ratos alimentados com dieta aterogênica. Os resultados demonstraram melhora no perfil lipídico, na atividade antioxidante e na inflamação dos ratos alimentados com a dieta suplementada com melancia em pó (HONG et al., 2014).

6 ARTIGO CIENTÍFICO

Pectin from *Citrullus lanatus* bark: orally administered activate peritoneal macrophages of mice

Tanise Cirolini Michelotti¹, Bianca Busato¹, Carmen Lucia Oliveira Petkowicz¹
and Guilhermina Rodrigues Noletto^{1*}

¹Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Paraná, Brazil.

CEP 81.531-980, Curitiba-PR, Brazil.

*Corresponding author: guinoletto@yahoo.com.br; +55 41 3361 1535

Abstract

Immunomodulation is one of the most significant potential activities of pectic polysaccharides. A pectin from watermelon rind (LW) previously extracted and characterized was chemically modified, giving rise to the fraction LWM. LW, LWM and modified citrus pectin (MCP) were evaluated for their immunomodulatory activities *in vitro* and *in vivo*. No changes in the nitric oxide production by macrophages treated with LW, LWM and MCP was observed. However, LW, LWM and MCP increased the number of activated macrophages and phagocytic activity in mouse with oral administration of 200mg/Kg. The results suggest that these polymers have an immunomodulatory potential, however, its necessary additional studies to infer that type of effects, the magnitude, and the mechanisms by which these effects occur.

1 Introduction

Plant polysaccharides have attracted great attention due to their activities as biological response modified (BRM) (Schepetkin & Quinn et al., 2006; Yin & Li, 2019). In general, modulation of immune system and anticancer activities are the most studied effects (Pienta et al., 1995; Huang et al., 2021). Ramberg et al.

(2010) summarized studies with different polysaccharides exhibiting immunomodulatory effects which were detected in various tissues after oral administration. Among the main effects observed, the authors highlight the stimulation the blood immune system of healthy humans and improvement in the survival rate in cancer patients (Ramberg et al., 2010).

In respect to plant polysaccharides, there are various aspects that contribute to these biomolecules are target of the interest of investigations; unlimited source of obtention, high structural diversity, low toxicity and in certain cases to provide a destination for plant wastes (Cunha et al., 2009; Yin & Li, 2019; Petkowicz & Reichembach, 2020). Pectins are the class of plant-polysaccharides with high potential for studies aiming various biological applications (Thakur et al., 1997; Willats et al., 2006; Maxwell et al., 2012; Popov & Ovodov, 2013; Musa et al., 2020). These polymers are components of plant cell wall being found in fruits and vegetables, but in different amounts (Petkowicz et al., 2017; Beukema et al., 2020; Prado et al., 2020; Busato et al., 2020), what provides many possibilities to obtain a great variety of structures according to the extraction conditions (Masuelli & Blumenberg, 2020).

Pectin is a heteropolysaccharide predominantly containing galacturonic acid (GalA) residues and comprises four main regions - homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan I (RG I), rhamnogalacturonan II (RG II) and xylogalacturonan (XG). HG is the major type of pectin in cell walls, accounting for 60-65% of the total pectin amount. It is a linear homopolymer of α -1,4 linked galacturonic acid. HG is partially methyl esterified at the C-6 carboxyl and/or O-acetylated at O-2 or O-3. Pectins can be classified as low DM pectins (DM < 50%) or high DM pectins (DM > 50%). RG-I accounts for 20-35% of the pectin and contains a backbone composed of a repeating disaccharide [α -D-GalA-1,2- α -L-Rha-1-4-] $_n$. RGI are highly branched by neutral monosaccharide (mainly α -L-arabinose and β -D-galactose) side chains, which are attached to the rhamnose residues (Mohen, 2008; Voragen et al., 2009; Maxwell et al., 2012; Beukema et al., 2020).

Evidence from different studies have shown that the biological activities of pectins, such as immunomodulation, are closely related to their chemical structure and molecular features (Jin et al., 2012; Yang et al., 2019). Thus, the

different conditions and plant sources used for pectin extraction can provide polymers with different structural characteristics and, therefore, different biological activities (Caffall et al., 2009; Amorim et al., 2016). In addition, chemical and/or enzymatic modification can be used to tailor pectins for new properties and purposes. A well-known example is the modified citrus pectin (MCP), which has lower molar mass, and DM and higher galactose content than the native biopolymer (Courts, 2013; Eliaz & Raz, 2019). The modification aims to obtain pectins that could be absorbed by the body and exert systemic effects, differently from native pectins (Courts, 2013; Eliaz & Raz, 2019).

Regarding the immunomodulant properties, most studies evaluate the effects of pectins on the activation of macrophages *in vitro*; measuring phagocytic activity, release cytokines and chemokines, nitric oxide and ROS, production (Amorim et al., 2016; Sun et al., 2019; Busato et al., 2020; Huang et al., 2021; Zhu et al., 2021). Consequently, modulation of immunity by pectins may have an impact on the host's ability to respond rapidly and potently to a pathogen diversity.

Considering the biomedical potential of pectins, it is interesting to look for new structures and advantageous plant sources. Watermelon consumption generates a large amount of rind for discarding; therefore, it is of great interest to find an appropriate destination for this waste (Al-sayed & Ahmed, 2013; Saleem et al., 2020). A pectin from watermelon rind was obtained by acid extraction and characterized by Petkowicz et al. (2017). The pectin, named LW, had 68% GalA, 2.9% Rha, 0.6% Ara and 22.6% Gal. Low (Ara + Gal)/Rha ratios were observed, indicated that short side chains are attached to the RG-I portion and as demonstrated by the monosaccharide composition, they are mainly galactans. The isolated pectin had DM higher than 50%, being classified as HM pectin. To our knowledge, there are no studies that report the effects of pectins isolated from watermelon rind administered orally in mice.

The aim of this study was to investigate the effects of the native pectin from watermelon rind (LW), the pectin after modification (LWM) and to compare with a commercial modified citrus pectin (MCP) *in vivo*, aiming to establish the relationship between structure and biological activity.

2. Experimental

2.1 *Modification of pectin*

The modification of LW was performed according to Wai et al. (2010) with some adaptations. LW was solubilized in concentration of 1.5% (w/v) in distilled water and the pH was adjusted to 10.0 with NaOH (3 M). After incubation for 1 h at 50–60° C, the preparation was cooled to room temperature - the pH reduced to 3.0 with HCl (3 M) and maintained overnight in the same conditions. Next, the preparation was precipitated with ethanol (3 vol), kept in the freezer for 24 h and centrifuged at 1800 rpm for 20 min (20°C). After discarding of the supernatant, to the pellet was added ethanol and centrifuged again, and the precipitated frozen for lyophilization. This pectin was designated as modified pectin (LWM). The modified citrus pectin (MCP) was obtained commercially (Pectasol-C).

2.2 *Determination of the monosaccharide composition of pectins*

Pectins were hydrolyzed with 2 M TFA at 120°C for 2 h. After the acid removal, the hydrolysates were reduced with NaBH₄ (Wolfson & Thompson, 1963b) and then acetylated using pyridine and acetic anhydride (Wolfson & Thompson, 1963a). The resulting alditol acetates were examined by gas-liquid chromatography (GLC) and identified by their fragmentation profile, and retention times compared with standards. Analyses by gas-liquid chromatography (GLC) were performed in a THERMO Trace GC Ultra chromatograph, with a flame ionization detector, using helium as carrier gas 1.0 mL.min⁻¹. A fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm), model DB-225 (Sloneker, 1972). The content of uronic acid was estimated by the *m*-hydroxydiphenyl method (Blumenkrantz & Asboe-hansen, 1973).

2.3 *Determination of the degree of methyl-esterification (DM)*

The DM was determined by Fourier transform-infrared (FT-IR) from the areas of absorption bands at 1749 cm⁻¹ (methyl esterified carboxylic group) and 1630 cm⁻¹ (carboxylic ion) as previously described (Vriesmann & Petkowicz, 2009). Spectra were obtained from KBr-sample discs using a Perkin Elmer

Spectrum RXI FT-IR Spectrometer (Perkin Elmer Instruments, Massachusetts, USA) in the range of 4000 to 400 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} from 64 scans.

2.4 Animals

Female albino Swiss mice (6-8 week-old) were housed at $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ under a 12/12h light–dark cycle and had free access to a standard laboratory diet (Purine®) and water *ad libitum*. All recommendations of the Brazilian National Law (n. 6.638, November 5, 1979) for scientific management of animals were respected. In addition, animal handling procedures for scientific research were approved by the Animal Ethics Committee of UFPR number 1413. For *in vivo* assays, mice were treated for 5 days with LW, LWM and MCP at 200 mg/Kg using oral gavage feeding needles. Control groups were treated with equal volume of PBS. 1 hour before isolation, one animal received an intraperitoneal injection with 50 $\mu\text{g/kg}$ of LPS (*E. coli*; 0111:B4), which was used as a positive control.

2.5 Peritoneal macrophage isolation

Peritoneal macrophages were obtained according to Noleto et al. (2002). For *in vitro* analysis, mice were euthanized by inhalational anesthetic (Isofluran), the peritoneal cavity was exposed and 10 ml of phosphate buffered saline solution (HBSS) were infused into their peritoneal cavity. The collected exudate was centrifuged at 2500 rpm, at 4°C for 15 min and the pellet formed was suspended in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium containing 5% fetal bovine serum (FBS). Then, the cells were counted and plated according to each experiment. After 2h at 37°C under 5% CO_2 for adhesion, non-adherent cells were removed by washing once with HBSS at 37°C . To the adherent macrophages, was added medium containing pectin and incubated in the same conditions varying the time according to each experimental protocol. For *in vivo* analyses, the peritoneal exudate from animals previously treated with pectins was obtained by infusing 3 ml of HBSS, centrifugated and plated as described.

2.6 Measurement of the macrophages viability

Peritoneal exudate cells (5×10^5 cells/well) in 96-well plates were incubated for adhesion as described. After 2h, medium (control) or pectins (50, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$) was added to the adherent macrophages. After 48h, the cell viability was evaluated using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method as described by Mosmann (1983) and Noleto et al. (2002).

2.7 Measurement of macrophage activation from mice treated with pectins orally

For morphological evaluation and phagocytic activity, adherent macrophages from peritoneal exudate cells (2×10^5 cells/well) of mice orally treated with 200 mg/Kg of pectins (LW, LWM and MCP) or LPS (50 $\mu\text{g/Kg}$), as positive control, were added in a 24-well plate containing glass coverslips and incubated for 2 h at 37 °C under 5% CO_2 .

2.7.1 Morphological analysis

After incubation as described, the cells were washed twice with HBSS pH 7.4, fixated for 5 min in Bouin solution, stained with hematoxylin for 1 min and with eosin for 30 s, and dehydrated in successive solutions of pure acetone, acetone: xylene (2:1, 1:1 and 1:2) and pure xylene. The slides were then mounted with Entellan® and examined microscopically (Amorim et al., 2016).

2.7.2 Phagocytic activity

After the incubation, the yeast (ratio of macrophages/yeasts 1:5) was added and incubated in the same conditions for 1 h. Then, non-phagocytated yeasts were removed by washing 2 times with HBSS. To cells was added Bouin solution for 5 min to fixation, stained with Giemsa for 15 min and mounted with Entellan®. The preparations were examined in an optical microscopy, to obtain the ratio of phagocytized yeasts/macrophages (Amorim et al., 2016).

2.8 Quantification of nitric oxide production

The nitric oxide (NO) production was indirectly assessed by measuring nitrite in the culture medium using the Griess reaction with modifications, as previously described (Keller et al., 1990). For *in vitro* analysis, peritoneal exudate cells (5×10^5 cells/well) were incubated in 96-well plates in the presence or absence of pectins (50, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$) or LPS (100 ng/mL) as positive control for 48h. Then, 100 μl of supernatants were mixed with 100 μl of Griess reagent and wait 10 min.

For *in vivo* analysis, were used 100 μl of the supernatants isolated from the peritoneal exudate of mice orally treated with pectins (200 mg/Kg). Absorbance was measured at 550 nm in microplate reader (Epoch®). The nitrite concentration was calculated from a sodium nitrite standard curve. The results are expressed as μmol .

2.9 Statistical analysis

The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) test, one or two-way, depending on the experiment, followed by Tukey's test for average comparison. Experimental values were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) and significance was defined as $p < 0.05$.

For *in vivo* experiments five animals per group were used, considering one animal as a replicate.

3 Results and discussion

3.1 Chemical composition of pectins

LW was subjected to sequential treatment with alkali and acid in order to produce a modified pectin (LWM). The monosaccharide composition of LW, LWM and MCP is given in Table 1. The polysaccharides had galacturonic acid (GalA) as the main component, followed by galactose, which arose from RG I side chains. LWM had increased content of RG I compared to LW and the amounts of HG and RG I were similar to MCP. The modification process also decreased

the degree of methyl-esterification (DM). LW was an HM-pectin while LWM was a LM-pectin. However, LWM had a higher DM than the MCP, which was completely de-esterified. The de-esterification observed after the pectin modification can be attributed to acid and alkali treatment (Canteri et al., 2021) and the decrease of uronic acid content can be attributed to the chemical β -elimination, one of the mechanisms of nonenzymatic degradation of pectins, which occur mainly in alkali conditions. This reaction cleaves and de-esterifies the homogalacturonan (HG) backbone, generating oligomers of polygalacturonic acid and rhamonogalacturonan I (RG-I) fractions (Canteri et al., 2012; Maxwell et al., 2012).

The results obtained for LWM are in agreement with the study of Fracasso et al. (2018), who performed chemical modification of citrus pectin in the same conditions of the present study. Samples of modified pectins had higher galactose amounts (18.0% for S1-MCP; 15.1% for S2-MCP; 10% for S3-MCP) when compared to native ones (7.0%; 12.0% and 8.5%, respectively). The content of uronic acid decreased in modified pectins (45.5% for S1-MCP; 59.2% for S2-MCP; 63.2% for S3-MCP) when compared to native ones (63.3%; 71.8% and 80.1%, respectively). In addition, a reduction of 17.3% in the DM of sample S1-N was observed. Amorim et al. (2016) demonstrated that the alkaline treatment of a pectin extracted from cacao pod husk decreased uronic acid content (from 66% to 56%) and DM (from 56.6% to 20.8%) and increased galactose (from 16.8% to 19.7%) and rhamnose (from 10% to 18%) levels. Similarly, for pepper pectin (DM 85%) the acid treatment gave rise to a modified fraction with lower DM (17%) (Nascimento et al., 2017). Cao et al. (2020) used UV-H₂O₂ oxidation system to prepare modified citrus pectin (MCP). The authors observed a decreased in the uronic acid content and DM and increased amounts of neutral sugars, mainly galactose.

Table 1. Structural characteristics of pectins

	LW*	LWM	MCP
Monosaccharide composition (%)			
GalA	68.7	65.0	67.4
Rha	2.9	3.5	6.0
Fuc	0.1	-	-

Ara	0.6	0.9	4.3
Xyl	0.5	1.0	0.8
Man	0.6	0.7	0.9
Gal	22.6	27.3	17.9
Glc	4.0	1.5	2.5
Structural features			
HG	65.8	61.5	61.4
RG-I	29.0	35.2	34.2
DM	61.5	38.9	-

HG = GalA - Rha and RG-I = 2(Rha) + Ara + Gal

*From Petkowicz et al. (2017)

3.2 Effects of LW, LWM and MCP on viability and metabolism of peritoneal macrophages

The investigation of the cytotoxicity of LW, LWM and MCP on peritoneal macrophages was performed by MTT assay. This method evaluates the metabolic activity of viable cells, since only viable cells possess active dehydrogenases enzymes able to reduce the tetrazolium salts to purple formazan product (Reilly et al., 1998; Ghasemi et al., 2021). In this sense, reduced absorbance infers cell death or not viable cells, suggesting toxicity. In case of macrophages, whose metabolism is significantly increased when these cells are activated - the MTT method is also used to evaluate this particular phenomenon in these cells, in addition of the cell viability (Gerlier et al., 1986; Xiong et al., 2011). The effects of LW, LWM and MCP on peritoneal macrophages are depicted in Figure 1 and Figure 2. Of the three pectins studied, only LW affected the cell viability in concentrations at 250 µg/mL and 500 µg/mL, decreasing by ~28% and ~32%, respectively, in respect to untreated macrophages (control). LWM and MCP were not cytotoxic in the evaluated conditions, since no significant reduction of the absorbance in comparison to control was observed.

The effects of pectins from watermelon rind on viability of macrophages observed in this study were different to those observed to pectins from cacao pod husks (OP and MOP). The authors observed that native pectin from cacao (OP) did not cause reduction on viability of macrophages. On the other hand, the de-esterified form (MOP), with DM of 20.8%, reduced the viability to ~ 80% in respect to control at 400 µg/mL (Amorim et al., 2016). In the present study, the native

pectin LW showed to be toxic, but the modified form (LWM) with DM of 38.9% did not affect the viability of macrophages. The results of these studies do not allow a precise relationship between the cytotoxicity and chemical structures, since pectins containing high degree of methylation (HM), LW (61.5%) and OP (56.6%), exhibited different effects on reduction of cell viability. Similar to OP, an HM pectin from broccolis (FB) with DM of 56.2% did not affect the viability of macrophages at 500 $\mu\text{g/mL}$ (Busato et al. 2020). Differently of LW, FB and MOP, a pectin isolated from radish leaves (RWP) did not affect the viability of peritoneal macrophages compared to the control with 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Son et al., 2021). Similarly of pectin RWP, a pectin extracted from the peels of Korean *Citrus* Hallabong not affect the viability of macrophages in concentration up to 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Lee et al., 2014).

Different from observed, LW exhibited high toxicity in comparison with two pectic polysaccharides (RCAP-1 and RCAP-2) isolated from the roots of *Codonopsis pilosula*, with 60% e 68% DM respectively. These polysaccharides did not exhibit cytotoxicity on RAW264.7 macrophages even at the highest concentration (1000 $\mu\text{g/mL}$) (Sun et al., 2019). Similarly to LW, a pectin extracted from pumpkin (CMDP-4b), with DM 89.4%, exerted significant suppressive effects on RAW264.7 macrophages only at 500 $\mu\text{g/mL}$ (Huang et al., 2021).

In respect to the increase of metabolism, only LWM triggered this phenomenon on macrophages in all concentrations evaluated – evidenced by the increase of absorbance from 50 $\mu\text{g/mL}$ in relation to LW and MCP (Figure 2).

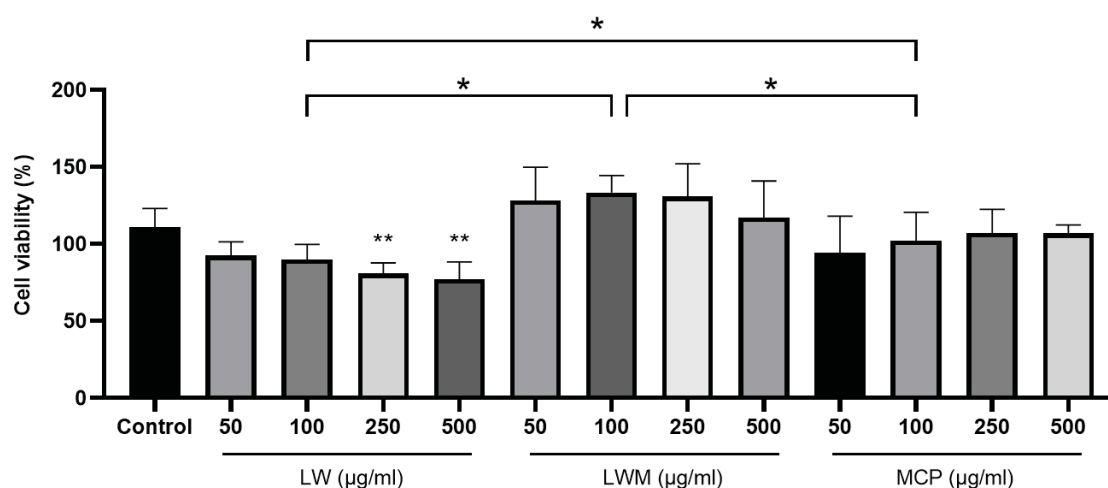


Figure 1. Effect of pectins (LW, LWM and MCP) on viability of peritoneal macrophages. Murine peritoneal macrophages were exposed for 48 h to the pectins and cell viability was determined by MTT assay. Culture medium was used as control, corresponding to 100% viability. The results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 2$, each experiment in triplicate). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control.

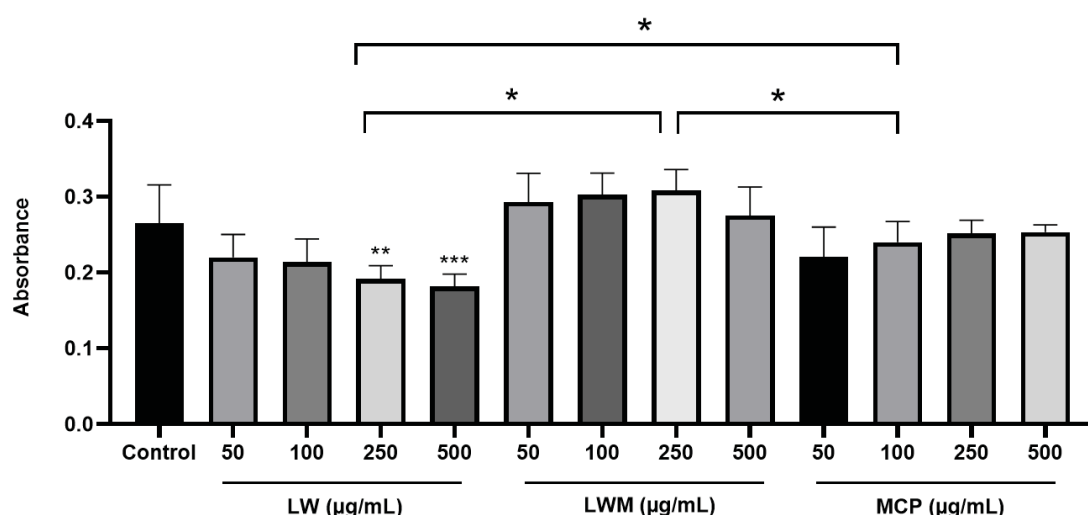


Figure 2. Effect of pectins (LW, LWM and MCP) on viability of peritoneal macrophages in absorbance. Murine peritoneal macrophages were exposed for 48 h to the pectins and cell viability was determined by MTT assay. The results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 2$, each experiment in triplicate). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control.

3.3 Effect of LW, LWM and MCP on modulation of macrophages

Macrophage activation is an important step in immune defense (Liao et al, 2015). These cells exhibit highlighted plasticity due their capacity of be modulated to execute innumerable functions to maintain the health maintenance and

disease prevention (Duque & Descoteaux, 2014; Hirayama et al., 2017). Upon pathological stimulation or injury and the presence of certain molecules, macrophages can be activated to phagocytosis, production of NO, reactive oxygen species and ample variety of cytokines to augment innate immune responses (Lee et al., 2005). In this sense, the macrophages are used to evaluate molecules with immunomodulatory potential. In the present study, the level of NO produced by peritoneal macrophages incubated for 48h with LW, LWM and MCP was measured. NO has a short biological half-life hampering its direct measurement. A simple and sensitive method of measurement the unstable molecule of NO is the Griess assay, that measures NO indirectly by the production of nitrite. Nitrite is the stable degradation product of NO that accumulate in supernatants of biological samples that release nitric oxide (Archer et al., 1995; Berkels et al., 2004). The results (Figure 3) showed high level of nitrite production by macrophages in presence of LPS, a potent stimulator of cells of the monocytic lineages (Sweet & Hume, 1996). Pectins did not affect the production of nitrite. Similarly, a commercial homogalacturonan and the native pectin (OP) from *Theobroma cacao* did not stimulate the NO production in macrophages incubated with 100 and 200 µg/mL. However, the de-esterified form (MOP) increase NO levels by approximately 2.5-fold compared to control (Amorim et al., 2016). MOP has galactose as the main neutral monosaccharide and low DM, similar characteristics of MCP, which has been shown to increase NO production *in vitro* (He et al., 2021). However, these results were not reproduced by LWM and by MCP.

Similarly, Cui et al. (2020) evaluated three pectic polysaccharides (AMAP-1, AMAP-2 and AMAP-3). AMAP-1 and AMAP-2 had higher galactose (26.9% and 9.5%) and arabinose (18.4% and 23.5%) contents and lower amounts of galacturonic acid (44.6% and 54.2%) compared to AMAP-3 (4.2% of galactose, 6.8% of arabinose and 77.9% of galacturonic acid). The authors observed an increase in NO release by macrophages treated with AMAP-1 and AMAP-2 at 40 and 200 µg/mL, but not with AMAP-3. The authors suggested that immune activity may be related to the side chains of the RG I region. Two pectic polysaccharides, CMPP-1 (3.13-50 µg/mL) and CMPP-2 (6.25-50 µg/mL) from kiwano peels increased the NO production in a dose-dependent manner. CMPP-1 and CMPP-

2 had 45.95% and 51.75% of galacturonic acid, respectively and rhamnose, galactose and arabinose accounted for more than half of the total neutral monosaccharides, which indicated high amount of RG-I in the two fractions (Zhu et al., 2021). CMPP-1 and CMPP-2 had lower HG (32% and 35%) and higher RG I (51% and 47%) than LW, LWM and MCP, corroborating the hypothesis that NO release is mainly due to the RG I regions. However, these results are not in agreement with the study by Sun et al. (2019) in which pectic polysaccharides containing high amounts of HG region and small amounts of RG-I region enhanced the NO release in the culture medium compared with the control group.

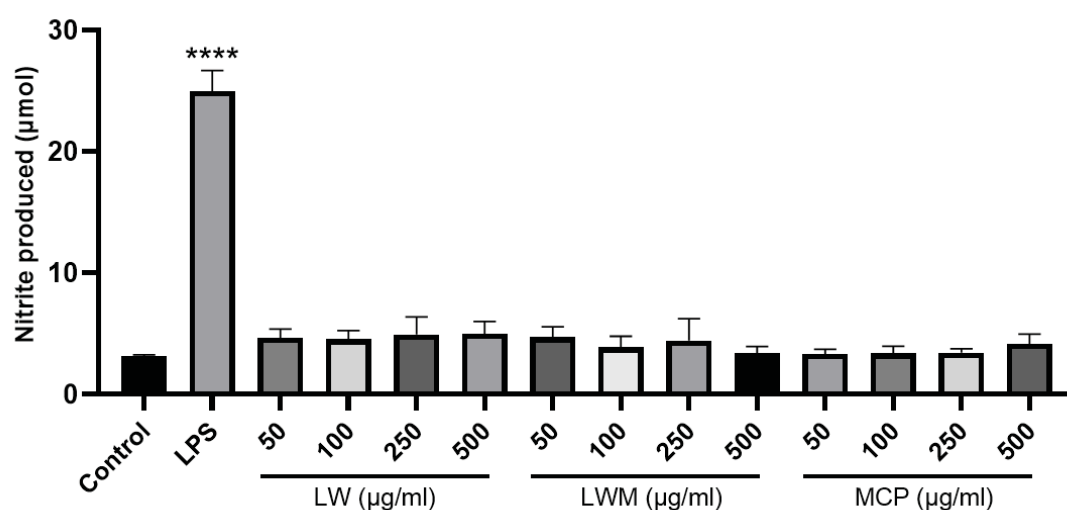


Figure 3. Level of nitrite in supernatant of macrophages peritoneal incubated with pectins LW, LWM and MCP. The results are expressed as mean $\pm$ SD (each experiment in triplicate). **** $p < 0,0001$ in respect to untreated macrophages (control).

To evaluate whether the pectins would be able of activate macrophages *in vivo*, mice were treated with pectins orally and the peritoneal macrophages isolated. Figure 4 shows that no NO production occurred by macrophages from animals treated with pectins. In agreement with these findings, a pectin extracted from *Brassica oleracea var. italica* (FB) did not stimulate NO production by macrophages in the same conditions (Busato et al., 2020). FB had 56% of methyl esterification, 68% galacturonic acid, 7% rhamnose and 17% of galactose, similar structural features of LW, LWM and MCP, with galactose and rhamnose being

the main neutral monosaccharides. However, FB had higher DM than LWM and MCP. In addition, Wang et al. (2015) found that intragastric administration (50, 100, 200 mg/Kg) of high-methoxyl homogalacturonan pectin (85% DM) increased the peritoneal macrophage secretion of NO.

The results of the present study and the literature are in agreement with the hypothesis that NO release by macrophages depends on the chemical features of the pectin and it seems that this ability is mainly associated with the RG I regions.

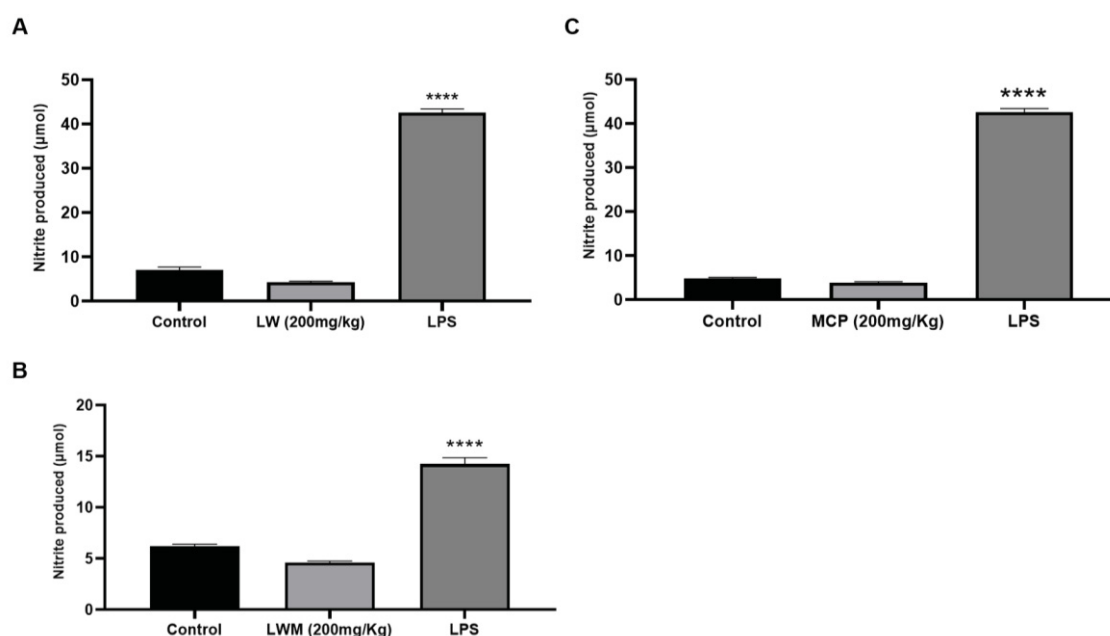


Figure 4. Effect of pectins LW (A), LWM (B) and MCP (C) on NO production by macrophages from orally treated mice (200 mg/Kg) with polymers. The NO production was indirectly assessed by measuring nitrite and LPS (50 µg/Kg) was used as a positive control. The results are expressed as mean $\pm$ SD. **** $p < 0,0001$ between the control and pectins.

3.4 Effects of LW, LWM and MCP on morphology and phagocytic activity of peritoneal macrophages

In contact with certain stimuli, macrophages assume morphology characteristic, identified by various cytoplasmic projections and increase in the

cell size and the nucleus size (Van, 1988; Xu et al., 2015). The activation of peritoneal macrophages from mice orally treated with pectins (200 mg/Kg) was also evaluated by changes of morphology and phagocytic activity. The results are shown in Figure 5. The number of peritoneal macrophages with morphologically activated profile obtained from mice after treatment with LW, LWM and MCP increased significantly in comparison to the control group (Figure 5A, B and C). In the control group of LW, LWM and MCP, approximately 9%; 17% and 15% of macrophages were in activated state. However, the percentage of activated cells reached 21.5%; 28% and 36.2% for LW, LWM and MCP, respectively. LW and MCP were significantly different in number of macrophages with morphology activated (Figure 6).

Only a few studies evaluating the action of pectins by oral administration were found in the literature. In previous study, our group evaluated the effects of pectin from broccolis with similar protocol used in the present study (Busato et al., 2020). The number of macrophages morphologically activated of mice orally treated with 200 mg/Kg reached 15%, while only 7% was observed in the control group. In the same study, the authors also observed increase of 40% in the number of activated macrophages after incubation with FB (500 µg/mL) *in vitro*.

Most studies evaluating the effect of pectins on the morphology of macrophage are *in vitro*. Amorim et al. (2016) showed that the treatment with a modified pectin from *Theobroma cacao* (MOP) increased about 80% the number of activated macrophages at a concentration of 200 µg/mL. Other studies have shown similar results *in vitro*. Moretão et al. (2013) found that an arabinogalactan increased the percentage of activated macrophages in ~91% at 300 µg/mL, while ~37% was observed in the control group. A rhamnogalacturonan with a type I structure (RG I) containing arabinogalactan branches showed increased in number of morphologically activated macrophages about 78% at 50 µg/mL and in the control group, approximately 60% of the macrophages were activated (Iacomini et al. 2005). Similarly, an arabinogalactan (AE-AG) induced peritoneal macrophage activation. About 70% of cells treated with this fraction (1–50 µg/mL) presented morphology of activated cells, while in the control group 40% of macrophages were activated (Simas et al., 2012). These results also support the

hypothesis that macrophage activation may occur mainly due to the presence of RG I regions.

The phagocytosis is one of the most important abilities of macrophages, maintaining homeostasis of the body by removing pathogens and damaged cells (Ross, 2002; Zhan et al., 2020). In the present study, the phagocytic activity was determined from the ratio of phagocytized yeasts/macrophage. Macrophage from mice orally treated with pectins promoted a significant increase in the phagocytic activity compared with the control group (Figure 5D, E and F). However, no difference between the pectins was observed (Figure 6B). Similar results were obtained by Busato et al. (2020), who observed an increase in phagocytic activity following oral administration of 200 mg/Kg of a pectin from broccolis. Wang et al. (2015) found that intragastric administration (50, 100, 200 mg/Kg) of high-methoxyl homogalacturonan pectin (85% DM) augmented the macrophage phagocytic activity. LW, LWM, MCP and FB had galactose as the main neutral monosaccharide and Li et al. (2018) suggest that galactose side chain residues may play a crucial role in macrophage phagocytosis.

The results of the present study are in agreement with the literature. However, most studies are *in vitro*. Song et al. (2022) prepared a pectic polysaccharide (designated CCP2) from *Clausena lansium* (Lour.) Skeels fruit. CCP2 had 42.8% DM and was mainly composed of galacturonic acid (62.2%), galactose (15.3%), arabinose (16.6%) and rhamnose (4.4%). This polymer exhibited enhanced phagocytic activity of RAW 264.7 macrophages in the concentration range of 10–200 µg/mL. Moretão et al. (2003) showed increase in phagocytic activity by macrophages from arabinogalactan treated mice at 25 mg/mL. A pectin extracted from pumpkin (CMDP-4b), with 89.4% DM, increased the phagocytic activity of macrophages at 62.5, 125 and 250 µg/mL (Huang et al., 2021). In contrast, native pectin from cacao (OP) and the de-esterified form (MOP) did not produce a significant increase in the phagocytic activity of murine peritoneal macrophages (Amorim et al., 2016).

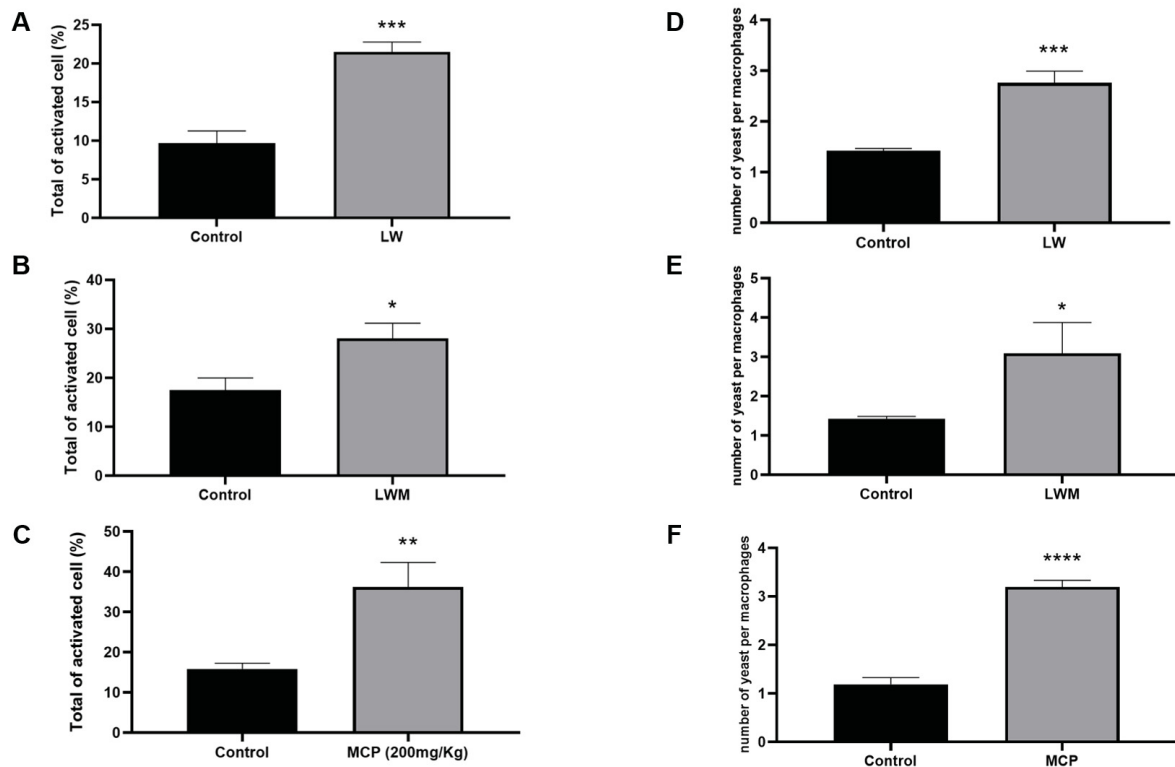


Figure 5. Effect of pectins LW, LWM and MCP on activated macrophages and phagocytic activity from mice orally treated with polymers (200 mg/Kg). Figure A, B and C show the percentage of activated macrophages in relation to total counted macrophages. Figure D, E and F show effect of pectins on phagocytic activity of peritoneal macrophages (Ratio of phagocytized yeasts/macrophages). Results are expressed as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ significant difference from the control (medium) group.

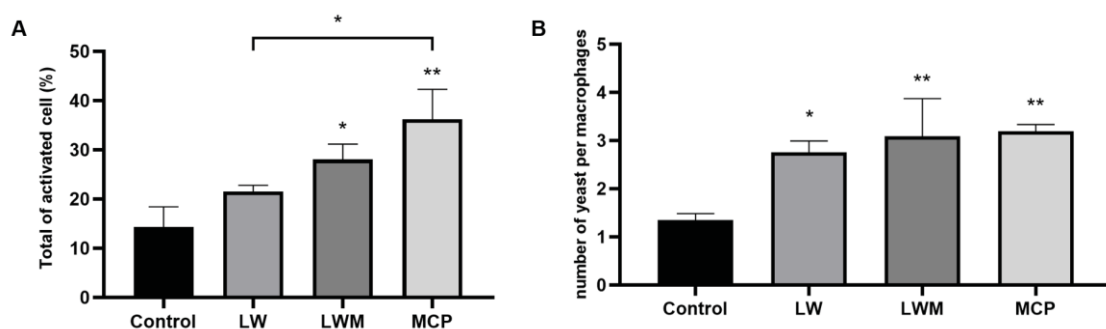


Figure 6. Comparison between of pectins (LW, LWM and MCP) on activated macrophages and phagocytic activity from mice orally treated with polymers (200 mg/Kg). Figure A and B show effect of pectins in percentage of activated macrophages in relation to total counted macrophages and on phagocytic activity of peritoneal macrophages, respectively. Results are expressed as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant difference from the control (medium) group.

4. Conclusions

Native pectin (LW) extracted from watermelon rind, its modified form (LWM) and commercial citrus pectin (MCP) were able to modulate some macrophage functions. The treatment with the pectins *in vivo* increased the number of macrophages morphologically activated and the phagocytic activity. However, no increase in nitric oxide production was detected under the conditions evaluated. The results of this work indicate that, although the pectins (LW and LWM) have an immunomodulatory potential, the chemical modification of LW did not change the parameters evaluated in macrophages in relation to native pectin. It is suggested that these polymers have a biological response modified potential, but are necessary additional studies to precisely determine the effects triggered by the pectins.

References

- Amorim, J. C., Vriesmann, L. C., Petkowicz, C. L., Martinez, G. R., & Noleto, G. R. (2016). Modified pectin from *Theobroma cacao* induces potent pro-inflammatory activity in murine peritoneal macrophage. *International journal of biological macromolecules*, 92, 1040-1048.
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 5, 491.
- Archer, S. L., Shultz, P. J., Warren, J. B., Hampl, V., & DeMaster, E. G. (1995). Preparation of standards and measurement of nitric oxide, nitroxyl, and related oxidation products. *Methods*, 7(1), 21-34.
- Berkels, R., Purol-Schnabel, S., & Roesen, R. (2004). Measurement of nitric oxide by reconversion of nitrate/nitrite to NO. In *Nitric Oxide Protocols* (pp. 1-8). Humana Press.
- Beukema, M., Faas, M. M., & de Vos, P. (2020). The effects of different dietary fiber pectin structures on the gastrointestinal immune barrier: impact via gut microbiota and direct effects on immune cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(9), 1364-1376.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Busato, B., de Almeida Abreu, E. C., de Oliveira Petkowicz, C. L., Martinez, G. R., & Noleto, G. R. (2020). Pectin from *Brassica oleracea* var. *italica* triggers immunomodulating effects in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 431-440.
- Cao, J., Yang, J., Yue, K., & Wang, Z. (2020). Preparation of modified citrus pectin (MCP) using an advanced oxidation process with hydroxyl radicals generated by UV-H₂O₂. *Food Hydrocolloids*, 102, 105587.
- Cui, Y. S., Li, Y. X., Jiang, S. L., Song, A. N., Fu, Z., Dong, C. X., ... & Qiao, W. (2020). Isolation, purification, and structural characterization of polysaccharides from *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* and their immunostimulatory activity

in RAW264. 7 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 270-278.

Cunha, P. L. R. D., Paula, R. C. M. D., & Feitosa, J. (2009). Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, 32, 649-660.

do Nascimento, G. E., Winnischofer, S. M. B., Ramirez, M. I., Iacomini, M., & Cordeiro, L. M. C. (2017). The influence of sweet pepper pectin structural characteristics on cytokine secretion by THP-1 macrophages. *Food Research International*, 102, 588-594.

Fracasso, A. F., Perussello, C. A., Carpiné, D., de Oliveira Petkowicz, C. L., & Haminiuk, C. W. I. (2018). Chemical modification of citrus pectin: Structural, physical and rheological implications. *International journal of biological macromolecules*, 109, 784-792.

Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*, 94(1-2), 57-63.

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.

He, K., Zeng, Y., Tian, H., Zhang, Z., Zhang, H., Huang, F., & Yu, F. (2021). Macrophage immunomodulatory effects of low molecular weight peptides from *Mytilus coruscus* via NF- κ B/MAPK signaling pathways. *Journal of Functional Foods*, 83, 104562.

Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2017). The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 92.

Huang, L., Zhao, J., Wei, Y., Yu, G., Li, F., & Li, Q. (2021). Structural characterization and mechanisms of macrophage immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from *Cucurbita moschata* Duch. *Carbohydrate Polymers*, 269, 118288.

- Iacomini, M., Serrato, R. V., Sassaki, G. L., Lopes, L., Buchi, D. F., & Gorin, P. A. (2005). Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation. *Fitoterapia*, 76(7-8), 676-683.
- Jin, M., Zhao, K., Huang, Q., Xu, C., & Shang, P. (2012). Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review. *Carbohydrate polymers*, 89(3), 713-722.
- Keller, R., Keist, R., Wechsler, A., Leist, T. P., & Van der Meide, P. H. (1990). Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing: a comparative analysis of the roles of reactive nitrogen intermediates and tumor necrosis factor. *International journal of cancer*, 46(4), 682-686.
- Lee, E. H., Park, H. R., Shin, M. S., Cho, S. Y., Choi, H. J., & Shin, K. S. (2014). Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean Citrus Hallabong. *Carbohydrate polymers*, 111, 72-79.
- Lee, K. Y., & Jeon, Y. J. (2005). Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus*. *International immunopharmacology*, 5(7-8), 1225-1233.
- li Xiong, S., Li, A., Huang, N., Lu, F., & Hou, D. (2011). Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus*. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1273-1280.
- Li, S., Yang, G., Yan, J., Wu, D., Hou, Y., Diao, Q., & Zhou, Y. (2018). Polysaccharide structure and immunological relationships of RG-I pectin from the bee pollen of *Nelumbo nucifera*. *International journal of biological macromolecules*, 111, 660-666.
- Masuelli, M., & Blumenberg, M. (2020). *Pectins: extraction, purification, characterization and applications*. BoD—Books on Demand.
- Maxwell, E. G., Belshaw, N. J., Waldron, K. W., & Morris, V. J. (2012). Pectin—an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science & Technology*, 24(2), 64-73.

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.

Moretão, M. P., Buchi, D. F., Gorin, P. A., Iacomini, M., & Oliveira, M. B. M. (2003). Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunology Letters*, 89(2-3), 175-185.

Musa, N., & Wong, T. W. (2020). Design of polysaccharidic nano-in-micro soft agglomerates as primary oral drug delivery vehicle for colon-specific targeting. *Carbohydrate polymers*, 247, 116673.

Noletto, G. R., Mercê, A. L. R., Iacomini, M., Gorin, P. A., Soccol, V. T., & Oliveira, M. B. M. (2002). Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. *Molecular and cellular biochemistry*, 233(1), 73-83.

Petkowicz, C. L. O., Vriesmann, L. C., & Williams, P. A. (2017). Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. *Food Hydrocolloids*, 65, 57-67.

Pienta, K. J., Nailk, H., Akhtar, A., Yamazaki, K., Replogle, T. S., Lehr, J., & Raz, A. (1995). Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 87(5), 348-353.

Popov, S. V., & Ovodov, Y. S. (2013). Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. *Biochemistry (Moscow)*, 78(7), 823-835.

Prado, S. B., Beukema, M., Jermendi, E., Schols, H. A., de Vos, P., & Fabi, J. P. (2020). Pectin interaction with immune receptors is modulated by ripening process in papayas. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.

Ramberg, J. E., Nelson, E. D., & Sinnott, R. A. (2010). Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition journal*, 9(1), 1-22.

- Reichembach, L. H., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2021). Pectins from alternative sources and uses beyond sweets and jellies: An overview. *Food Hydrocolloids*, 118, 106824.
- Reilly, T. P., Bellevue III, F. H., Woster, P. M., & Svensson, C. K. (1998). Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochemical pharmacology*, 55(6), 803-810.
- Ross, J. A (2002). The biology of the macrophage. *The macrophage*.
- Sakurai, M. H., Matsumoto, T., Kiyohara, H., & Yamada, H. (1999). B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement. *Immunology*, 97(3), 540.
- Schepetkin, I. A., & Quinn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International immunopharmacology*, 6(3), 317-333.
- Simas-Tosin, F. F., Abud, A. P. R., De Oliveira, C. C., Gorin, P. A. J., Sasaki, G. L., Bucchi, D. F., & Iacomini, M. (2012). Polysaccharides from peach pulp: Structure and effects on mouse peritoneal macrophages. *Food chemistry*, 134(4), 2257-2260.
- Son, S. U., Park, H. Y., Suh, H. J., & Shin, K. S. (2021). Evaluation of antitumor metastasis via immunostimulating activities of pectic polysaccharides isolated from radish leaves. *Journal of Functional Foods*, 85, 104639.
- Song, C., Huang, F., Liu, L., Zhou, Q., Zhang, D., Fang, Q., ... & Niu, H. (2022). Characterization and prebiotic properties of pectin polysaccharide from *Clausena lansium* (Lour.) Skeels fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194, 412-421.
- Suh, H. J., Yang, H. S., Ra, K. S., Noh, D. O., Kwon, K. H., Hwang, J. H., & Yu, K. W. (2013). Peyer's patch-mediated intestinal immune system modulating activity of pectic-type polysaccharide from peel of *Citrus unshiu*. *Food chemistry*, 138(2-3), 1079-1086.

- Sun, Q. L., Li, Y. X., Cui, Y. S., Jiang, S. L., Dong, C. X., & Du, J. (2019). Structural characterization of three polysaccharides from the roots of *Codonopsis pilosula* and their immunomodulatory effects on RAW264. 7 macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 556-563.
- Sweet, M. J., & Hume, D. A. (1996). Endotoxin signal transduction in macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 60(1), 8-26.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., & Rao, M. A. (1997). Chemistry and uses of pectin—a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(1), 47-73.
- Van, F. R (1988). Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, v. 281.
- Voragen, A. G., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263-275.
- Vriesmann, L. C., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2009). Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 72-79.
- Wang, H., Gao, T., Du, Y., Yang, H., Wei, L., Bi, H., & Ni, W. (2015). Anticancer and immunostimulating activities of a novel homogalacturonan from *Hippophae rhamnoides* L. berry. *Carbohydrate Polymers*, 131, 288-296.
- Willats, W. G., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Acetylation. *Methods in carbohydrate chemistry*, v. 2, n. 2, p. 211-215

Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963b) Reduction with Sodium Borohydride. *Methods in carbohydrate chemistry, Vol. II: reactions of carbohydrates*, 65-67.

Xu, X., Bi, D. C., Li, C., Fang, W. S., Zhou, R., Li, S. M., ... & Shen, L. M. (2015). Morphological and proteomic analyses reveal that unsaturated guluronate oligosaccharide modulates multiple functional pathways in murine macrophage RAW264. 7 cells. *Marine drugs*, 13(4), 1798-1818.

Yang, X., Xue, Z., Fang, Y., Liu, X., Yang, Y., Shi, G., ... & Zhao, L. (2019). Structure-immunomodulatory activity relationships of Hedysarum polysaccharides extracted by a method involving a complex enzyme combined with ultrasonication. *Food & function*, 10(2), 1146-1158.

Yin, M., Zhang, Y., & Li, H. (2019). Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. *Frontiers in immunology*, 10, 145.

Zhan, Q., Wang, Q., Lin, R., He, P., Lai, F., Zhang, M., & Wu, H. (2020). Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel acid polysaccharide isolated from the pulp of Rosa laevigata Michx fruit. *International journal of biological macromolecules*, 145, 1080-1090.

Zhu, M., Huang, R., Wen, P., Song, Y., He, B., Tan, J., ... & Wang, H. (2021). Structural characterization and immunological activity of pectin polysaccharide from kiwano (Cucumis metuliferus) peels. *Carbohydrate polymers*, 254, 117371.

Zhu, M., Huang, R., Wen, P., Song, Y., He, B., Tan, J., ... & Wang, H. (2021). Structural characterization and immunological activity of pectin polysaccharide from kiwano (Cucumis metuliferus) peels. *Carbohydrate polymers*, 254, 117371.

7 CONCLUSÃO

A modificação química da pectina nativa (LW) por tratamento ácido e alcalino reduziu o grau de metil esterificação e aumentou o teor de ramnogalacturonana I. As três pectinas avaliadas (LW, LWM e MCP) foram capazes de modular algumas funções dos macrófagos. O tratamento oral com 200 mg/Kg dos polímeros aumentou o número de macrófagos morfológicamente ativos e a atividade fagocítica. Entretanto, não foi observado aumento na produção de óxido nítrico nas condições avaliadas. Os resultados deste trabalho indicam que, embora as pectinas (LW e LWM) possuam um potencial imunomodulador, a modificação química de LW não alterou os parâmetros avaliados em macrófagos em relação a pectina nativa. Dessa forma, sugere-se que esses polímeros exercem um potencial imunomodulador, todavia, são necessários estudos adicionais para inferir o tipo de efeito e sua magnitude, bem como por quais mecanismos que tais efeitos ocorrem.

8 REFERÊNCIAS

AL-SAYED, Hanan MA; AHMED, Abdelrahman R. Utilization of watermelon rinds and sharlyn melon peels as a natural source of dietary fiber and antioxidants in cake. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 1, p. 83-95, 2013.

AMARANTE-MENDES, Gustavo P. et al. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2379, 2018.

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

ANDO, Izuru et al. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- κ B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 8, p. 1155-1162, 2002.

ASGHAR, Muhammad Nadeem et al. Phytochemical and in vitro total antioxidant capacity analyses of peel extracts of different cultivars of Cucumis melo and Citrullus lanatus. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 2, p. 226-232, 2013.

AZÉMAR, Marc et al. Clinical benefit in patients with advanced solid tumors treated with modified citrus pectin: a prospective pilot study. **Clinical medicine. Oncology**, v. 1, p. CMO. S285, 2007.

BAGAL-KESTWAL, Dipali R.; PAN, M. H.; CHIANG, Been-Huang. Properties and applications of gelatin, pectin, and carrageenan gels. **Bio monomers for green polymeric composite materials**, p. 117-140, 2019.

BARBOSA, Jhonatas Rodrigues; DE CARVALHO JUNIOR, Raul Nunes. Polysaccharides obtained from natural edible sources and their role in modulating the immune system: Biologically active potential that can be exploited against COVID-19. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 223-235, 2021.

BELKHEIRI, Anissa et al. Extraction, characterization, and applications of pectins from plant by-products. **Applied Sciences**, v. 11, n. 14, p. 6596, 2021.

BEUKEMA, Martin; FAAS, Marijke M.; DE VOS, Paul. The effects of different dietary fiber pectin structures on the gastrointestinal immune barrier: impact via gut microbiota and direct effects on immune cells. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1364-1376, 2020.

BEUTLER, Bruce. Innate immunity: an overview. **Molecular immunology**, v. 40, n. 12, p. 845-859, 2004.

BROUNS, F. et al. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. **European journal of clinical nutrition**, v. 66, n. 5, p. 591-599, 2012.

BUSATO, Bianca et al. Pectin from Brassica oleracea var. italica triggers immunomodulating effects in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 431-440, 2020.

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

CAMPBEL, M. Watermelond rind pectin extraction. **Submitted to the Faculty of the Graduate College of the Oklahoma State University**, 2006.

CANTERI, Maria HG et al. Pectin: from raw material to the final product. **Polímeros**, v. 22, p. 149-157, 2012.

CHAN, Godfrey Chi-Fung; CHAN, Wing Keung; SZE, Daniel Man-Yuen. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of hematology & oncology**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2009.

CHEN, Ruoxin et al. Structure–immunomodulatory activity relationships of dietary polysaccharides. **Current Research in Food Science**, 2022.

COURTS, Fraser L. Profiling of modified citrus pectin oligosaccharide transport across Caco-2 cell monolayers. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 1, p. 22-31, 2013.

CUI, Yong-Sheng et al. Isolation, purification, and structural characterization of polysaccharides from Atractylodis Macrocephalae Rhizoma and their

immunostimulatory activity in RAW264. 7 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 270-278, 2020.

CUNHA, Pablyana Leila R. da; PAULA, Regina Célia M. de; FEITOSA, Judith. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, p. 649-660, 2009.

DAMMAK, Mariem Itaimi et al. Partial characterization and antitumor activity of a polysaccharide isolated from watermelon rinds. **International journal of biological macromolecules**, v. 136, p. 632-641, 2019.

DORE, Celina Maria P. Guerra et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of an extract rich in polysaccharides of the mushroom *Polyporus dermatopus*. **Antioxidants**, v. 3, n. 4, p. 730-744, 2014.

ELIAZ, Isaac; RAZ, Avraham. Pleiotropic effects of modified citrus pectin. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2619, 2019.

FANG, Tian et al. Modified citrus pectin inhibited bladder tumor growth through downregulation of galectin-3. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 39, n. 12, p. 1885-1893, 2018.

FAO. 2021. World Food and Agriculture: Statistical Yearbook 2021. Rome.

FUKUNAGA, Tetsuya et al. Effects of the soluble fibre pectin on intestinal cell proliferation, fecal short chain fatty acid production and microbial population. **Digestion**, v. 67, n. 1-2, p. 42-49, 2003.

GAO, Xiaoge et al. The inhibitory effects of a rhamnogalacturonan I (RG-I) domain from ginseng pectin on galectin-3 and its structure-activity relationship. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 47, p. 33953-33965, 2013.

GAVLIGHI, Hassan Ahmadi et al. Extraction, characterization and immunomodulatory property of pectic polysaccharide from pomegranate peels: Enzymatic vs conventional approach. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 698-706, 2018.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Research in immunology**, v. 149, n. 7-8, p. 685-688, 1998.

GUO, Qingbin et al. Immunomodulatory and antivirus activities of bioactive polysaccharides and structure-function relationship. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 27, p. 100301, 2022.

HAN, Sang B. et al. Polysaccharide isolated from the radix of Platycodon grandiflorum selectively activates B cells and macrophages but not T cells. **International immunopharmacology**, v. 1, n. 11, p. 1969-1978, 2001.

HARTATI, Indah; RIWAYATI, Indah; SUBEKTU, Endah. Microwave assisted extraction of watermelon rind pectin with different kind of acid solution. **ICETIA2014**, p. 27-30, 2014.

HAYASHI, Adam et al. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. **Alternative Medicine Review**, v. 5, n. 6, p. 546-552, 2000.

HIRAYAMA, Daisuke; IIDA, Tomoya; NAKASE, Hiroshi. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 92, 2017.

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

HO, Lee-Hoon; CHE DAHRI, Norhidayah. Effect of watermelon rind powder on physicochemical, textural, and sensory properties of wet yellow noodles. **CyTA-Journal of Food**, v. 14, n. 3, p. 465-472, 2016.

HOLLOWAY, Warren D.; TASMAN-JONES, Clifford; MAHER, Kerry. Pectin digestion in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 37, n. 2, p. 253-255, 1983.

HONG, Mee Young et al. Watermelon consumption improves inflammation and antioxidant capacity in rats fed an atherogenic diet. **Nutrition Research**, v. 35, n. 3, p. 251-258, 2015.

HOSSEIN, Ghamartaj et al. Synergistic effects of PectaSol-C modified citrus pectin an inhibitor of Galectin-3 and paclitaxel on apoptosis of human SKOV-3 ovarian cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 12, p. 7561-7568, 2013.

HOU, Chunyan et al. An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 248-255, 2020.

HUANG, Linlin et al. Structural characterization and mechanisms of macrophage immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from Cucurbita moschata Duch. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, p. 118288, 2021.

JENKINS, David JA et al. Decrease in postprandial insulin and glucose concentrations by guar and pectin. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 1, p. 20-23, 1977.

JIANG, Li Na et al. Comparisons of microwave-assisted and conventional heating extraction of pectin from seed watermelon peel. In: **Advanced Materials Research**. Trans Tech Publications Ltd, 2012. p. 1801-1806.

JIE, Duo et al. Immunostimulating effect of polysaccharides isolated from Ma-Nuo-Xi decoction in cyclophosphamide-immunosuppressed mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 45-52, 2020.

KNAUP, Bastian et al. Model experiments mimicking the human intestinal transit and metabolism of D-galacturonic acid and amidated pectin. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 7, p. 840-848, 2008.

KONG, Fanli et al. Antioxidant activity of polysaccharide-enriched fractions extracted from pulp tissue of Litchi Chinensis sonn. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2152-2165, 2010.

KUMAR, Harsh et al. Fruit and vegetable peels: Utilization of high value horticultural waste in novel industrial applications. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2812, 2020.

LARSEN, Nadja et al. Potential of pectins to beneficially modulate the gut microbiota depends on their structural properties. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 223, 2019.

LAURENT, M. A.; BOULENGUER, P. Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 4, p. 445-454, 2003.

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

LECLERE, Lionel; CUTSEM, Pierre Van; MICHIELS, Carine. Anti-cancer activities of pH-or heat-modified pectin. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 128, 2013.

LI, Danyang; WU, Minghua. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-24, 2021.

LI, Qiu et al. Bioactive polysaccharides from natural resources including Chinese medicinal herbs on tissue repair. **Chinese medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2018.

LI, Shanshan et al. Polysaccharide structure and immunological relationships of RG-I pectin from the bee pollen of *Nelumbo nucifera*. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 660-666, 2018.

LU, Yonggang et al. Modified citrus pectin inhibits galectin-3 function to reduce atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 1, p. 647-653, 2017.

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

MERHEB, Rihab; ABDEL-MASSIH, Roula M.; KARAM, Marc C. Immunomodulatory effect of natural and modified Citrus pectin on cytokine levels in the spleen of BALB/c mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 121, p. 1-5, 2019.

MINZANOVA, Salima T. et al. Biological activity and pharmacological application of pectic polysaccharides: A review. **Polymers**, v. 10, n. 12, p. 1407, 2018.

MOHNEN, Debra. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.

MORRIS, Victor J. et al. The bioactivity of modified pectin fragments. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 1, n. 1, p. 21-37, 2013.

MORT, Andrew et al. Structure of xylogalacturonan fragments from watermelon cell-wall pectin. Endopolygalacturonase can accommodate a xylosyl residue on the galacturonic acid just following the hydrolysis site. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 7, p. 1212-1221, 2008.

MUSA, Nafisah; WONG, Tin Wui. Design of polysaccharidic nano-in-micro soft agglomerates as primary oral drug delivery vehicle for colon-specific targeting. **Carbohydrate polymers**, v. 247, p. 116673, 2020.

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

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

NEGLO, David et al. Comparative antioxidant and antimicrobial activities of the peels, rind, pulp and seeds of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. **Scientific African**, v. 11, p. e00582, 2021.

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

NITURE, Suryakant K.; REFAI, Lubna. Plant pectin: a potential source for cancer suppression. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 9, 2013.

NUSSINOVITCH, A. Hydrocolloid Applications. 1a Edição ed. Israel: Chapman & Hall, 1997. DOI: 10.1007/978-1-4615-6385-3.

OGUTU, F. O. et al. Ultrasonic Modified Sweet Potato Pectin Induces Apoptosis like Cell Death in Colon Cancer (HT-29) Cell Line. *Nutr Cancer*, v. 70, n. 1, p. 136-145, 2018.

PARK, Hye-Ryung et al. Antitumor and antimetastatic activities of pectic polysaccharides isolated from persimmon leaves mediated by enhanced natural killer cell activity. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 460-466, 2017.

PARK, Hye-Ryung et al. Signaling pathway and structural features of macrophage-activating pectic polysaccharide from Korean citrus, Cheongkyool peels. **International journal of biological macromolecules**, v. 137, p. 657-665, 2019.

PELLEY, Ronald P.; STRICKLAND, Faith M. Plants, polysaccharides, and the treatment and prevention of neoplasia. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 11, n. 3&4, 2000.

PIENTA, Kenneth J. et al. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 5, p. 348-353, 1995.

PIENTA, Kenneth J. et al. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 5, p. 348-353, 1995.

POPOV, Sergey V. et al. Anti-inflammatory activity of low and high methoxylated citrus pectins. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 59-63, 2013.

PRADO, Samira BR et al. Pectin interaction with immune receptors is modulated by ripening process in papayas. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

RAMACHANDRAN, C. et al. Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects between Modified Citrus Pectin and Honokiol. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017.

RAMBERG, Jane E.; NELSON, Erika D.; SINNOTT, Robert A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. **Nutrition journal**, v. 9, n. 1, p. 1-22, 2010.

REDDY, L. Veeranjaneya et al. Wine production by novel yeast biocatalyst prepared by immobilization on watermelon (*Citrullus vulgaris*) rind pieces and characterization of volatile compounds. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 748-752, 2008.

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

RIMANDO, Agnes M.; PERKINS-VEAZIE, Penelope M. Determination of citrulline in watermelon rind. **Journal of Chromatography A**, v. 1078, n. 1-2, p. 196-200, 2005.

ROMDHANE, Molka Ben et al. Optimization of polysaccharides extraction from watermelon rinds: Structure, functional and biological activities. **Food Chemistry**, v. 216, p. 355-364, 2017.

SAKURAI, Masumi H. et al. Detection and tissue distribution of anti-ulcer pectic polysaccharides from *Bupleurum falcatum* by a polyclonal antibody. **Planta medica**, v. 62, n. 04, p. 341-346, 1996.

SALEEM, Muhammed; SAEED, Mohammed Tariq. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 805-810, 2020.

SANDVIK, A. et al. Oral and systemic administration of β -glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 148, n. 1, p. 168-177, 2007.

SARI, A. M.; ISHARTANI, D.; DEWANTY, P. S. Effects of microwave power and irradiation time on pectin extraction from watermelon rinds (*Citrullus lanatus*) with acetic acid using microwave assisted extraction method. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2018. p. 012085.

SCHEPETKIN, Igor A.; QUINN, Mark T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006.

SCHWARTZ, S. E. et al. Sustained pectin ingestion delays gastric emptying. **Gastroenterology**, v. 83, n. 4, p. 812-817, 1982.

SHIN, Myoung-Sook; PARK, Su Beom; SHIN, Kwang-Soon. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity by polysaccharide isolated from the peels of Citrus unshiu. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 576-583, 2018.

SONG, Can et al. Characterization and prebiotic properties of pectin polysaccharide from Clausena lansium (Lour.) Skeels fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 194, p. 412-421, 2022.

SUN, Qi-Li et al. Structural characterization of three polysaccharides from the roots of Codonopsis pilosula and their immunomodulatory effects on RAW264. 7 macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 556-563, 2019.

SUZUKI, Iwao et al. Immunomodulation by orally administered β -glucan in mice. **International journal of immunopharmacology**, v. 11, n. 7, p. 761-769, 1989.

THAKUR, Beli R. et al. Chemistry and uses of pectin—a review. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

TIAN, Lingmin et al. Effects of pectin supplementation on the fermentation patterns of different structural carbohydrates in rats. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 10, p. 2256-2266, 2016.

VICKERS, Neil J. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. **Current biology**, v. 27, n. 14, p. R713-R715, 2017.

VORAGEN, A. G. J. P. Pectins. **Food polysaccharides and their applications**, 1995.

VORAGEN, Alphons GJ et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263-275, 2009.

WILLATS, William GT; KNOX, J. Paul; MIKKELSEN, Jørn Dalgaard. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

WONG, Tin Wui; COLOMBO, Gaia; SONVICO, Fabio. Pectin matrix as oral drug delivery vehicle for colon cancer treatment. **Aaps PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 201-214, 2011.

WONGKAEW, Malaiporn et al. Mango Peel Pectin: Recovery, Functionality and Sustainable Uses. **Polymers**, v. 13, n. 22, p. 3898, 2021.

YAPO, Beda M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373-385, 2011.

YIN, Miao; ZHANG, Ying; LI, Hua. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. **Frontiers in immunology**, p. 145, 2019.

ZHAO, Xiaoyong et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a water soluble polysaccharide isolated from *Botrychium ternatum*. **Carbohydrate polymers**, v. 171, p. 136-142, 2017.

ZHAO, Yue et al. Natural polysaccharides with immunomodulatory activities. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 20, n. 2, p. 96-106, 2020.

ZHU, Minqian et al. Immunological Activity and Gut Microbiota Modulation of Pectin from Kiwano (*Cucumis metuliferus*) Peels. **Foods**, v. 11, n. 11, p. 1632, 2022.

ZHU, Minqian et al. Structural characterization and immunological activity of pectin polysaccharide from kiwano (*Cucumis metuliferus*) peels. **Carbohydrate polymers**, v. 254, p. 117371, 2021.