

## ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE CARBOIDRATO PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO AQUOSA DE GRÃOS DE QUEFIR

**Maria E. C. Moreira**

Universidade José do Rosário Vellano, Rod. MG-179, km 0, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

**Marcelo H. Santos e Ivan O. Pereira\***

Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva 714, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

**Vany Ferraz**

Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brasil

**Luiz C. A. Barbosa**

Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa - MG, Brasil

**José M. Schneedorf**

Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva 714, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

Recebido em 3/1/08; aceito em 30/4/08; publicado na web em 17/9/08

### ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF CARBOHYDRATE PRODUCED FROM AQUEOUS FERMENTATION OF KEFIR.

Kefir, a symbiont microorganism suspension, presents benefic effects to health. Some kefir grains were cultivated in brown sugar, allowing to isolate a substance named CSQ. This was evaluated on a biologic essay of mouse foot edema, presenting an inhibitory activity of  $30 \pm 4$  % against carrageenan after the stimulus. It was observed that a cultivation mean containing sucrose, and not the milky mean, lead to the production of different sugar polymeric chains of kefir. The results *in vivo* suggest that the CSQ exerted an anti-inflammatory activity.

Keywords: kefir; carbohydrate; anti-inflammatory.

## INTRODUÇÃO

O quefir, também conhecido como kefir, é originário do eslavo *Keif* que significa “bem-estar” ou “bem-viver”. É uma mistura probiótica original das montanhas Caucásicas da Rússia, podendo trazer vários benefícios para a saúde.<sup>1</sup>

O quefir é utilizado no Brasil como um produto da medicina popular, tendo hoje diversos efeitos probióticos relacionados à sua utilização.<sup>2</sup> A bebida pronta para consumo contém ácido láctico, assim como ácidos fórmico, succínico e propiônico, CO<sub>2</sub>, álcool etílico, diferentes aldeídos e traços de álcool isoamílico e acetona,<sup>3</sup> além de uma variedade de folatos.<sup>4</sup> Constitui-se de uma suspensão de microrganismos simbiotes formada por bactérias acidófilas e leveduras, que apresentam vários efeitos benéficos à saúde.<sup>5</sup> Ele pode ser cultivado em açúcar mascavo, leite ou sucos de frutas, sendo sua coloração dependente do substrato utilizado para cultivo. Os grãos são amarelos claros quando cultivados em leite. Se crescidos em açúcar mascavo, são ocre e pardos, ou purpúreos se cultivados em suco de uva.<sup>6</sup>

Nos grãos de quefir é encontrada uma diversidade microbiológica elevada, que inclui espécies de leveduras, bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido acético e fungos. A composição da população pode diferir, dependendo da origem dos grãos ou dos diferentes métodos de cultivo. Alguns microrganismos estão sempre presentes no simbiótico, mas outros nem sempre são encontrados, dependendo do método de cultura e substrato utilizado.<sup>7</sup> Em culturas lácteas encontra-se um polissacarídeo conhecido como quefirano, ou como fator de crescimento de quefir - KGF, que constitui um bioproduto carboidratado

secretado por algumas bactérias presentes nos grãos de quefir e que permite o encapsulamento de suas cepas microbianas em uma matriz de polissacarídeos. É um exopolissacarídeo parcialmente solúvel em água, composto de unidades repetitivas de monossacarídeos (galactose e glicose), na proporção de 1,1:0,9.<sup>5</sup>

Estudos realizados com quefirano demonstraram vários efeitos benéficos à saúde, dentre os quais a supressão do aumento da pressão sanguínea após 30 dias de tratamento em ratos com hipertensão induzida;<sup>8</sup> a redução do estresse, uma vez que apresentam atividades sobre a produção de  $\beta$ -interferon, cortisol e noradrenalina;<sup>9</sup> aumento da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais e pulmonares,<sup>10</sup> e aumento de células IgA nestes sítios;<sup>11</sup> atividade anti-tumoral;<sup>12</sup> atividade antimicrobiana;<sup>13</sup> efeito preventivo sobre diarreias associadas a antibióticos, por favorecer a flora intestinal normal, protegendo-a contra patógenos exógenos e mantendo seu balanço;<sup>1</sup> aumento da atividade da dipeptidase intestinal em ratos;<sup>14</sup> redução de lipídios sanguíneos, pressão arterial, glicose sanguínea e constipação intestinal.<sup>15</sup>

Nas investigações sobre as cepas produtoras de quefirano, há controvérsias, entretanto La Rivière e colaboradores<sup>16</sup> relataram que o *Lactobacillus brevis*, agora conhecido como *Lactobacillus kefir*, foi responsável pela produção de quefirano, ao passo que Kamdler e colaboradores<sup>17</sup> concluíram que o *L. kefir* não produz o quefirano. De acordo com Toba e colaboradores,<sup>18</sup> o principal produtor do polímero de quefirano nos grãos de quefir é o *Lactobacillus kefirifaciens* e algumas outras espécies não identificadas de *Lactobacillus*. A produção do exopolissacarídeo é uma importante característica das bactérias do ácido láctico encontradas em culturas de quefir em meio lácteo.<sup>19</sup> Será que no cultivo dos grãos utilizando açúcar mascavo como substrato é o quefirano um dos principais agentes envolvidos nas propriedades probióticas do quefir? Portanto, este estudo teve

\*e-mail: ivan.farma@bol.com.br

como objetivo isolar, caracterizar o carboidrato isolado do fermentado aquoso dos grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo e avaliar sua atividade antiinflamatória.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Obtenção do carboidrato

#### Cultivo dos grãos de quefir

O simbiótico utilizado foi obtido de amostras congeladas em freezer a -50 °C, presentes no Laboratório de Fitofármacos da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas – MG. A suspensão simbiótica de quefir foi cultivada em solução de açúcar mascavo solubilizado em água destilada (50 g L<sup>-1</sup>), com troca contínua do material nutriente a cada 24 h da cultura e sob temperatura ambiente.

#### Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau orgânico analítico, com exceção do açúcar mascavo comercial, obtido em fontes locais da Região dos Lagos, sul de Minas Gerais.

#### Isolamento do carboidrato

O isolamento da fração rica em carboidrato do quefir cultivado em meio aquoso foi feito de acordo com metodologia proposta por Micheli *et al.*,<sup>5</sup> com algumas alterações, depois de obtido o crescimento exponencial das culturas entre 7 e 15 dias. Os grãos de quefir foram colocados em um béquer contendo água destilada fervente, na proporção de 1:4, mantido sob agitação e fervura durante 1 h. Após esse período, a mistura foi resfriada e centrifugada (Fanem®, mod. 243, Brasil) a 12000 g por 20 min. O precipitado foi então descartado, misturando-se o sobrenadante em igual volume de etanol 93° gelado. Após esse tratamento, o produto foi mantido sob 4 °C por 15 h (*overnight*), sucedendo-se a centrifugação por 20 min a 12000 g. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi colocado em estufa à temperatura de 50 °C por 24 h.

### Caracterização da fração rica em carboidrato

#### Propriedades físico-químicas

##### Viscosidade intrínseca

A medida de viscosidade intrínseca foi realizada a partir da medição da viscosidade relativa,  $\eta_{rel}$ , representada pelo quociente dos tempos de fluxo da solução polimérica e do solvente.<sup>20</sup>

Foi preparada uma solução de CSQ na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> (0,1 %) em água destilada Milli-Q®. Após a solubilização (sob agitação, a 100 °C) a amostra foi resfriada e a solução foi transferida para um viscosímetro analógico (Ostwald, Pyrex). O conjunto foi colocado num banho a 26 °C por 15 min e iniciou-se a medida, por determinação do tempo de fluxo da solução polimérica (ou de eluição) numa dada região do viscosímetro. Esse procedimento foi repetido 5 vezes para cada amostra. A média dos tempos de fluxo foi dividida pelo tempo de fluxo do solvente, obtendo-se  $\eta_{rel}$ . Os dados foram obtidos eletronicamente pelo sistema Schott-Geraete (AVS 350).

Empregou-se a Equação de Billmeyer<sup>20</sup> para estabelecer uma relação entre viscosidade relativa e a intrínseca,

$$[\eta] = \frac{0,25\{(1 - \eta_{rel}) + 3 \ln \eta_{rel}\}}{c} \quad (1)$$

onde c = concentração (em %) da solução contendo o polímero.

##### Densidade relativa

Para a medida da densidade da solução de CSQ na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> (0,1% em água Milli-Q®), foi utilizado um picnômetro (Pyrex®) de 50 mL, de massa conhecida ( $m_0$ ). Posteriormente à introdução da amostra, adicionou-se água Milli-Q® até o picnômetro ficar totalmente preenchido. Quando o termômetro foi acoplado ao equipamento a 26 °C, efetuou-se a pesagem de todo o conjunto, obtendo-se a massa da amostra com líquido ( $m_{sl}$ ). Tendo-se a massa do picnômetro cheio do líquido ( $m_L$ ), a massa do picnômetro contendo solução de CSQ ( $m_s$ ) e a densidade do líquido ( $\rho_L$ ), calculou-se a densidade da amostra por meio da Equação 2.<sup>20</sup> A densidade do líquido foi calculada pelos resultados de  $m_L$  dividido pelo volume do picnômetro. O procedimento foi feito em triplicata.

$$\rho_p = \frac{\rho_L (M_s - M_0)}{(M_L - M_0) - (M_{sl} - M_s)} \quad (2)$$

onde,  $m_0$ : massa do picnômetro vazio;  $m_{sl}$ : massa da amostra com líquido;  $m_L$ : massa do picnômetro cheio de líquido;  $m_s$ : massa do picnômetro contendo solução de CSQ;  $\rho_L$ : densidade do líquido (a 26 °C).

##### Condutividade elétrica

Para a medida da condutividade elétrica da solução de CSQ na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> (0,1% em água Milli-Q®), foi utilizado um condutivímetro (Digimed 120 A, Brasil). O aparelho foi previamente calibrado com solução padrão de concentração 1,41  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , sendo este padrão da marca Digimed®.<sup>21</sup>

##### Espectrometria no infravermelho (IV)

Para a obtenção do espectro na região do IV foi usada uma mistura com 1 mg de CSQ pulverizado com 10 mg de KBr, obtendo-se uma pastilha homogênea, e seguindo-se leitura na região de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , em espectrômetro de infravermelho (Perkin Elmer FTIR 1000).<sup>22</sup>

### Determinação de carboidratos

#### Determinação de glicose livre

O teor de glicose total foi avaliado segundo método enzimático de glicose oxidase (Laborlab, Brasil). O teor foi calculado utilizando-se a Equação 3.

$$CD = \frac{(ABS_D - ABS_B)}{(ABS_p - ABS_B)} \times CP \quad (3)$$

onde, CD= concentração da amostra (mg dL<sup>-1</sup>);  $ABS_D$ = absorvância da amostra;  $ABS_B$ = absorvância do branco (alíquota que não contém a amostra);  $ABS_p$ = absorvância do padrão de glicose; CP= concentração do padrão de glicose (100 mg dL<sup>-1</sup>).

#### Cromatografia em camada delgada (CCD)

Uma amostra de 20 mg de CSQ foi hidrolisada com 20 mL de HCl (10%), sob aquecimento com refluxo e agitação magnética por 8 h. A solução resultante foi neutralizada com carbonato de sódio e submetida à cromatografia em camada delgada em cromatoplacas de sílica gel (20 x 20 cm, 0,25 mm de espessura), juntamente com padrões de frutose, glicose, galactose, ramnose e arabinose. O sistema solvente usado foi n-butanol:ácido acético:éter etílico:água (9:6:3:1) e o revelador uma solução de anisalaldeído:etanol:ácido acético:ácido sulfúrico (0,5:9:0,1:0,5), a 100 °C.<sup>23</sup>

### Cromatografia gasosa

Uma amostra de CSQ (20 mg) foi hidrolizada com 20 mL de HCl (10%), sob aquecimento com refluxo e agitação magnética por 8 h. Os açúcares obtidos foram convertidos em alditóis-acetatos através da reação com volumes iguais de anidrido acético e piridina (120 °C/2 h), seguindo-se cromatografia gasosa (CG) das amostras.<sup>23</sup> Utilizou-se o cromatógrafo a gás (nitrogênio) Varian modelo CP3380 com coluna capilar BP20 de 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm. As condições estabelecidas foram temperatura do injetor (250 °C), temperatura programada para a coluna (isoterma a 150 °C por 1 min, e até a 240 °C com variação de 10 °C min<sup>-1</sup>), temperatura do detector (260 °C), e fluxo do gás de arraste (2,0 mL min<sup>-1</sup>).

### Determinação da massa molecular

A massa molecular do CSQ foi estimada através da análise por cromatografia por permeação em gel (GPC), usando-se cromatógrafo líquido Shimadzu modelo C-R4A, com coluna GPC803-D (Shimadzu) de 300 x 7,8 mm e tendo como fase móvel dimetilformamida. As condições estabelecidas foram temperatura da coluna (25 °C), detector de índice de refração e fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A amostra foi dissolvida em dimetilformamida (1 mg mL<sup>-1</sup>) e o volume injetado foi de 20 µL. Utilizaram-se padrões de poliestireno com massas moleculares de 382000, 52000, 22000 e 8500 para comparação entre os tempos de retenção destes com os da amostra de CSQ.<sup>24</sup>

### Atividade antiinflamatória do CSQ

#### Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar machos (170 ± 50 g), provenientes do Biotério Central da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas- MG, e concedidos após aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética dessa Instituição (Protocolo 02 A/2005). Em todos os experimentos realizados *in vivo*, o número de ratos por grupo foi igual a 6. Os animais foram tratados com ração comercial e água *ad libitum*, durante todo o experimento, garantida sua adaptação por 7 dias em sala climatizada a 23 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 h, e em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção. Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas.

#### Ensaio de edema de pata induzido por carragenina

Os animais foram subdivididos em 3 grupos (n = 6/grupo). Conforme método descrito por Winter e colaboradores,<sup>25</sup> 24 h antes do experimento os animais ficaram em jejum. Os animais foram tratados por via oral com 1 mL de CSQ a 20 mg kg<sup>-1</sup> (grupo 1). Os animais do grupo 2 foram tratados com 1 mL contendo 10 mg kg<sup>-1</sup> de indometacina, e os do grupo 3, com igual volume de NaCl a 0,9%. Após 30 min os animais foram estimulados na pata direita (0,1 mL/pata) com 1 mg/pata de carragenina (Iota-Fluka Biochemika, EUA) e na pata esquerda, com igual volume de NaCl a 0,9%, como controle.

O edema produzido nas patas de cada animal foi determinado pela diferença entre as medidas das patas esquerda e direita, utilizando um paquímetro analógico (Vernier Caliper). As patas foram aferidas antes da aplicação da substância pró-inflamatória, e de hora em hora até completar 5 h após a aplicação do estímulo.

#### Análise estatística

Os ensaios foram conduzidos por delineamento inteiramente casualizado, tendo como parcela um animal. Foi conduzida análise de variância dos dados expressos por média ± erro padrão da média, satisfeitas as premissas do método, seguido por teste de Tukey-

Kramer para comparações múltiplas. Foi aceito como significativo o resultado que apresentou o P-valor menor que 0,05 em todos os cálculos. Foi utilizado pacote estatístico Origin®, versão 7.5 (Microcal Origin®, 7.5, EUA), para os cálculos de ajuste não linear dos dados, e GraphPad Instat® (versão 3.01, EUA), para os cálculos de estatística inferencial.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras suspensas, colocadas em ebulição por 1 h, precipitadas em solução alcoólica a 93%, apresentaram um rendimento de 1,1 g kg<sup>-1</sup> de grãos de quefir utilizado. Este dado foi diferente do encontrado por Micheli *et al.*<sup>5</sup> e Maeda *et al.*,<sup>8</sup> que obtiveram um rendimento de 2 e 2,5 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, quando isolaram o quefirano de cultura de láctea, e similar ao resultado encontrado por Rimada e Abraham,<sup>26</sup> que isolaram o polissacarídeo dos grãos de quefir cultivados em trigo (1,03 g kg<sup>-1</sup>).

A viscosidade intrínseca da solução de CSQ a 0,1% foi de 0,297 ± 0,030 dL g<sup>-1</sup>, sendo que o valor da solução de quefirano obtido por Micheli *et al.*<sup>5</sup> foi de 5,68 ± 0,50 dL g<sup>-1</sup>, em cultura de grãos de quefir em meio lácteo. Observa-se que o valor obtido para CSQ é cerca de 19 vezes menor que o valor obtido por Micheli *et al.*<sup>5</sup> para o quefirano. Correlacionando a massa molecular e a viscosidade intrínseca,<sup>20</sup> nota-se que a cadeia polimérica encontrada foi bem menor que a do quefirano obtido por culturas lácteas de quefir.

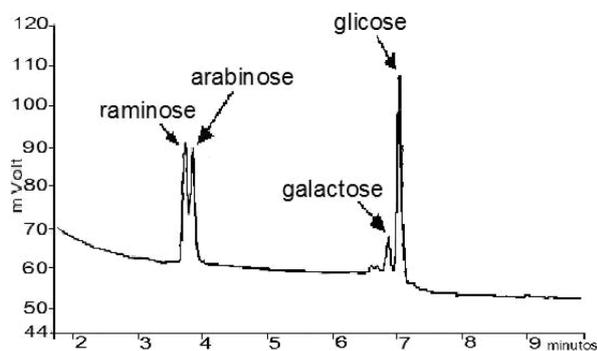
A condutividade elétrica da solução de CSQ a 0,1% foi de 2,46 µS cm<sup>-1</sup> sugerindo um grau de pureza similar ao valor de 1,20 µS cm<sup>-1</sup> obtido por Micheli *et al.*,<sup>5</sup> que utilizaram um procedimento adicional de diálise para a obtenção do carboidrato. O valor da densidade relativa da solução de CSQ a 0,1% foi de 1,0443 g mL<sup>-1</sup>.

Na caracterização da estrutura da amostra obtida pelo espectro na região do infravermelho (IV), a substância CSQ apresentou bandas de absorção fortes entre 3600-3100 (ν O-H) e 1070 cm<sup>-1</sup> (ν C-O), sugerindo presença de um componente polioidroxilado, além de bandas fracas de absorção em 2950-2880 (ν C-H), 1470 e 1390 cm<sup>-1</sup> (δ<sub>s</sub> C-H), que caracterizam a natureza alifática dessa substância. Estes dados estão de acordo com de outros carboidratos descritos na literatura, sejam estruturas de mono, oligo ou polissacarídeos. Dessa forma, compostos de estruturas diferentes podem apresentar espectros muito similares, não servindo o espectro no IV como o único parâmetro para caracterização estrutural de CSQ, mas para caracterizá-lo como um sacarídeo polioidroxilado.<sup>22</sup>

Não foram detectadas quantidades significativas de glicose livre nas amostras, as quais apresentaram valores de 2,58 ± 0,45 mg dL<sup>-1</sup>.

Pela análise de cromatoplaça de sílica gel revelada, contendo a amostra hidrolizada e os padrões glicose, frutose, galactose, arabinose e ramnose, pôde-se constatar pelos valores próximos de R<sub>f</sub>s (0,41; 0,41; 0,43; 0,45 e 0,55, respectivamente), e pela coloração das manchas, a possibilidade da presença dos monossacarídeos glicose, frutose, ramnose, galactose e/ou arabinose. Apesar desse método ser rápido e bastante eficaz, a determinação qualitativa para muitos compostos, neste caso, apresentou dúvidas na distinção dos monossacarídeos que possuem valores de R<sub>f</sub>s próximos. Dessa forma, utilizou-se um método mais preciso, a cromatografia gasosa (CG), que possui maior resolução para distinguir os constituintes das amostras de CSQ hidrolizada.

A análise por CG de CSQ hidrolizado confirmou a presença dos monossacarídeos: glicose (40%), ramnose (24%), galactose (10%) e arabinose (26%) (Figura 1). Esse resultado difere dos trabalhos de Maeda *et al.*,<sup>8</sup> Frengova *et al.*,<sup>19</sup> Yang *et al.*,<sup>27</sup> Micheli *et al.*,<sup>5</sup> Mukai *et al.*<sup>28</sup> e Kooiman,<sup>29</sup> onde se utilizou leite como substrato de cultivo, os quais encontraram glicose e galactose como monossacarídeos

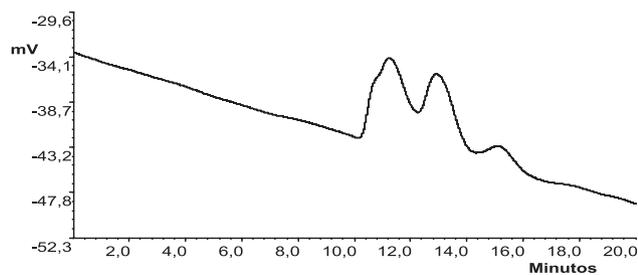


**Figura 1.** Cromatograma dos alditóis-acetatos do hidrolizado de CSQ, obtido por cromatografia gasosa

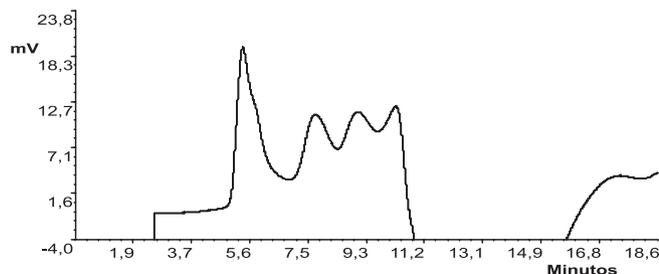
principais de composição da matriz polimérica.

A massa molecular do CSQ estimada por cromatografia por permeação em gel (GPC) está mostrada nas Figuras 2 e 3. Após ser estabelecida a relação entre Log (MM) e tempo de retenção para os padrões de polietileno (pela equação de regressão:  $\text{Log MM} = -0,33972 + 7,384$ ), utilizaram-se os tempos dos componentes da amostra de CSQ (Figura 4) para determinar suas massas moleculares.

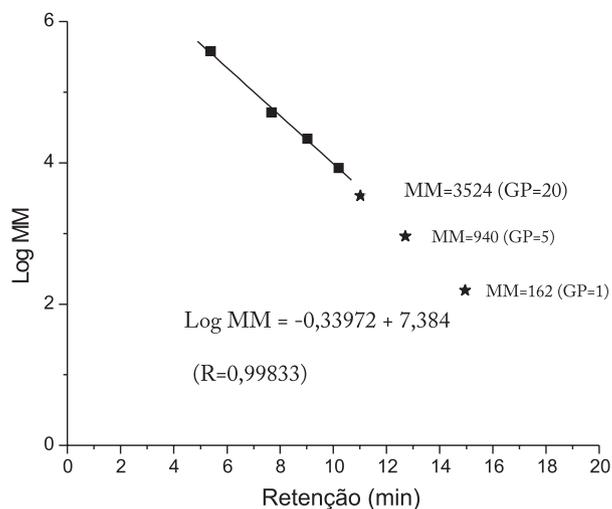
Pode-se verificar que foram obtidas três substâncias presentes no produto CSQ, uma das quais é a glicose. Os outros dois sacarídeos parecem possuir massa molecular média de 940 e 3524 Da, que corresponde a 5 e 20 unidades de glicose, respectivamente. Como pode ser observado, os tamanhos das cadeias poliméricas encontradas no CSQ (940 e 3524 Da) são menores que a do quefirano, 760000 e 20600 Da [<sup>29,15</sup> respectivamente], sugerindo tratar-se de dois componentes principais, a saber, um oligo e um polissacarídeo (Figura 4). A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry* - recomendação de 1996)<sup>30</sup> não delimita o número de resíduos de monossacarídeos presentes para ser classificado como oligo ou polissacarídeo,<sup>30</sup> mas convencionalmente é definido como oligossacarídeo aquele composto que fornecerá, quando hidrolisado, 3 a 10 unidades de monossacarídeos.<sup>31</sup> Dessa forma, podemos sugerir



**Figura 2.** Cromatograma de CSQ obtido por cromatografia por permeação em gel (GPC)



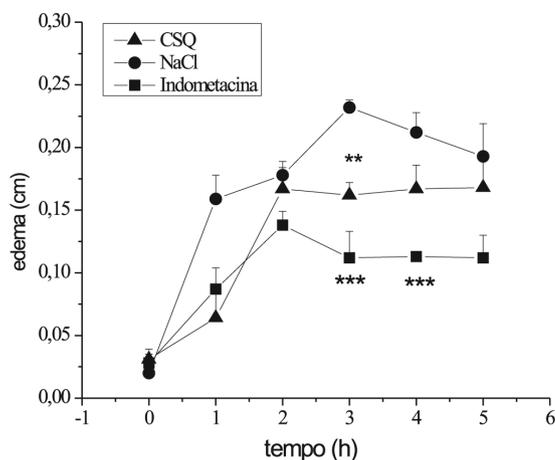
**Figura 3.** Cromatograma de padrões de poliestirenos, obtido por cromatografia por permeação em gel (GPC)



**Figura 4.** Massas moleculares (MM) dos padrões de poliestireno e de CSQ usando a relação logarítmica de MM e tempo de retenção das amostras por cromatografia de permeação em gel (equação de regressão:  $\text{Log MM} = -0,33972 + 7,384$  ( $R = 0,99833$ )). GP representa grau de polimerização da fração isolada. ★ amostra e ■ padrões de poliestireno

que o componente de maior massa se refere a um polissacarídeo com 20 unidades glicosídicas; o outro composto é um oligossacarídeo com apenas 5 resíduos de monossacarídeos em sua constituição.

O modelo de edema de pata é o mais utilizado para se avaliar o efeito antiinflamatório de fármacos e insumos farmacêuticos. A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas que induz resposta inflamatória local mensurável. Apresenta duas fases inflamatórias e uma terceira não característica. Na 1ª hora, logo após injeção de carragenina, há aumento da permeabilidade vascular mediada por histamina e serotonina. Na 2ª hora, o aumento da permeabilidade é resultado da liberação de cininas. Na 3ª hora, o aumento da permeabilidade vascular ocorre devido à ação das prostaglandinas.<sup>32</sup> A administração de carragenina (1 mg/pata a 0,1 mL) nas patas de ratos induziu edema de forma gradual (Figura 5).



**Figura 5.** Edema de pata induzido por 1 mg (0,1 mL) de carragenina. Grupo controle negativo tratado com 1 mL de NaCl representados por (●); Grupo controle positivo tratado com 1 mL contendo 10 mg kg<sup>-1</sup> de Indometacina (■); Grupo teste tratado com 20 mg kg<sup>-1</sup> a 1 mL CSQ (▲). Cada ponto representa média ± EPM (erro padrão da média) de n = 6 por grupo. \*\*\*p<0,001; teste de Tukey-Kram

O resultado mostra que o CSQ foi capaz de inibir o processo inflamatório  $30 \pm 4\%$  na 3ª hora ( $p < 0,001$ , Tukey-Kramer). A indometacina (controle positivo) foi capaz de inibir o processo inflamatório em  $52 \pm 9\%$ ,  $47 \pm 3\%$  na 3ª e 4ª horas, respectivamente ( $p < 0,001$ , Tukey-Kramer).

A resposta edematogênica é um dos sinais da resposta inflamatória decorrente do aumento da permeabilidade vascular, que ocorre na microcirculação, devido à ação dos mediadores liberados.<sup>33</sup> A inibição do edema nos animais que receberam tratamento com CSQ na dosagem de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  (30 min antes da aplicação do estímulo edematogênico - carragenina), ocorreu na 3ª hora, sendo similar à do grupo tratado com indometacina, o que sugere um mecanismo de ação baseado no envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico.<sup>34</sup> Diante de todas estas observações, pode-se supor como um dos mecanismos de ação sistêmica do composto a inibição da síntese de prostaglandinas, o que pode ser verificado pela presença, no carboidrato, de constituintes com ação anti-edematogênica. Resultado similar a este foi relatado por Rodrigues e colaboradores<sup>35</sup> que observaram, ao utilizar esse mesmo estímulo, uma inibição de 62 e 40% quando os animais foram tratados com suspensão de grãos de quefir e grãos desintegrados, respectivamente.

## CONCLUSÃO

Os estudos realizados indicaram que a utilização de um meio de cultura contendo sacarose, e não o meio lácteo, levou à produção de cadeias poliméricas de açúcares com MM determinados por permeação em gel de 940 e 3524 Da. A natureza e a proporção dos monossacarídeos identificados por CG foi de glicose, ramnose, galactose e arabinose (4:2,4:1:2,6), distintas das relatadas na literatura.

Finalmente, o carboidrato isolado na cultura de quefir em meio aquoso demonstrou atividade antiinflamatória, quando testado em animais em ensaio de edema de pata induzido por carragenina, em até  $30 \pm 4\%$ , o que sugere sua utilização como antiinflamatório, abrindo novas perspectivas na aplicação de novos agentes antiinflamatórios oriundos de carboidratos poliméricos.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponibilizado em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso gratuito.

## AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS

- Zubillaga, M.; Weill, R.; Postaire, E.; Goldman, C.; Caro, R.; *Nutr. Res.* **2001**, *21*, 569.
- Schneedorf, J. M.; Anfiteatro, D.; *Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação*, Tecmedd: São Paulo, 2004.
- Güven, A.; Gulmez, M.; *J. Vet. Med.* **2003**, *50*, 412.
- Patring, J. D. M.; Hjortmo, S. B.; Jastrebova, J. A.; Svensson, U. K.; Andlid, T. A.; Jägerstad, I. M.; *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *223*, 633.
- Micheli, L.; Uccelletti, D.; Palleschi, C.; Crescenzi, V.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *53*, 69.
- Guzel-Seydim, Z.; Seydim, A. C.; Greene, A. K.; *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 275.

- Garrote, G. L.; Abraham, A. G.; Antoni, G. L.; *J. Dairy Res.* **2001**, *68*, 639; Witthuhn, R. C.; Schoeman, T.; Britz, T. J.; *Int. Dairy J.* **2004**, *15*, 383.
- Maeda, H.; Zhu, X.; Omura, K.; Suzuki, S.; Kitamura, S.; *J. Agric. Food Chem.* **2004a**, *52*, 5533.
- Kabayama, S.; Osada, K.; Tachibana, H.; Katakura, Y.; Shirahata, S.; *Cytotechnology* **1997**, *23*, 119.
- Viderola, C. G.; Duarte, J.; Thangavel, D.; Perdigon, G.; Farnworth, E.; Matar, C.; *Eur. J. Inflammation* **2005**, *3*, 63; Viderola, C. G.; Perdigon, G.; Duarte, J.; Farnworth, E.; Matar, C.; *J. Dairy Res.* **2006**, *73*, 472.
- Viderola, C. G.; Perdigon, G.; Duarte, J.; Thangavel, D.; Farnworth, E.; Matar, C.; *Immunobiology* **2006**, *211*, 149.
- Liu, J. R.; Wang, S. Y.; Lin, Y. Y.; Lin, C. W.; *Nutr. and Cancer* **2002**, *44*, 183; Murofushi, M.; Shiomi, M.; Aibara, K.; *Japanese J. Med. Science Biology* **1983**, *36*, 49; Shiomi, M.; Sasaki, K.; Murofushi, M.; Aibara, K.; *Japanese J. Med. Science Biology* **1982**, *35*, 75.
- Rodrigues, K. L.; Caputo, L. R. G.; Carvalho, J. C. T.; Evangelista, J.; Schneedorf, J. M.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *25*, 404.
- Urdaneta, E.; Barrenetxe, J.; Aranguren, P.; Irigoyen, A.; Marzo, F.; Ibáñez, F. C.; *Nutr. Res.* **2007**, *27*, 635.
- Maeda, H.; Zhu, X.; Omura, K.; Suzuki, S.; Kitamura, S.; *BioFactors* **2004b**, *22*, 197.
- La Rivière, J. W. M.; Kooiman, P.; Schmidt, K.; *Arch. Microbiol.* **1967**, *59*, 269.
- Kamdler, O.; Kunath, P.; *Syst. Appl. Microbiol.* **1983**, *4*, 286.
- Toba, T.; Arhara, K.; Adachi, S.; *Millwissenschaft* **1987**, *42*, 565.
- Frengova, G. I.; Simova, E. D.; Beshkova, D. M.; Simov, Z. I.; *Z. Naturforsch* **2002**, *57*, 805.
- Mancini, S. D.; Matos, I. G.; Almeida, R. F.; *Polímeros* **2004**, *14*, 2.
- Harris, D.; *Análise Química Quantitativa*, 5ª ed., LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.: Rio de Janeiro, 2001.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 6ª ed., LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.: Rio de Janeiro, 2000.
- Ikan, R.; *Natural products: a laboratory guide*, 2ª ed., Academic Press: California, 1991.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato P. S.; *Introdução a Métodos Cromatográficos*, 6ª ed., Editora Unicamp: Campinas, 1995.
- Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G. W.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1962**, *111*, 544.
- Rimada, P. S.; Abraham, A. G.; *J. Dairy Res* **2001**, *68*, 653.
- Yang, Z. N.; Staaf, M.; Huttunen, E.; Widmalm, G.; *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 465.
- Mukai, T.; Toba, T.; Itoh, T.; Adachi, S.; *Carbohydr. Res.* **1990**, *204*, 278.
- Kooiman, P.; *Carbohydr. Res.* **1968**, *7*, 200.
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/00n01.html#01>, acessada em Janeiro 2006.
- El Khadem, H. S.; *Carbohydrate Chemistry. Monosaccharides and their oligomers*, Academic Press: California, 1988; Harborne, J. B.; *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*, 3ª ed., Chapman & Hall: London, 1998; Mahan, L. K.; Escott-Stump, S.; *Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*, 11ª ed., Roca: São Paulo, 2005.
- Di Rosa, M.; Giroud, J. P.; Willoughby, D. A.; *J. Pathol.* **1971**, *104*, 15.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K.; *Farmacologia*, 5ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2004.
- Carvalho, J. C. T.; *Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*, Tecmedd: São Paulo, 2004.
- Rodrigues, K. L.; Carvalho, J. C. T.; Schneedorf, J. M.; *Inflammopharmacology* **2005**, *13*, 485.