

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JENIFER MOTA RODRIGUES

**CAPACIDADE DE LIGAÇÃO *IN VITRO* À BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS
DOS EXTRATOS ISOLADOS DE FARELO DE SOJA**

CURITIBA

2012

JENIFER MOTA RODRIGUES

**CAPACIDADE DE LIGAÇÃO *IN VITRO* À BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS
DOS EXTRATOS ISOLADOS DE FARELO DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá

CURITIBA

2012

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá

TERMO DE APROVAÇÃO

Jenifer Mota Rodrigues

CAPACIDADE DE LIGAÇÃO *IN VITRO* À BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS DOS EXTRATOS ISOLADOS DE FARELO DE SOJA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá – Presidente
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Departamento de Farmácia – UFPR

Prof^a. Dr^a. Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – UFPR

Curitiba, 16 de fevereiro de 2012

Ao Robson, meu companheiro, por todo amor, incentivo e compreensão. À minha mãe e minha vó, Ana e Izabel, pelo amor incondicional, atenção, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, que incentivaram, foram solidárias, que torceram por mim. Mas bem sei que agradecer é sempre difícil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar, pois poderei cometer mais injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram do que fazer jus a todas que merecem.

Todos os que realizam um trabalho de pesquisa nunca o fazem sozinhos, embora seja solitário o ato da leitura e do escrever. Isaac Newton, em 1667, já escrevera “Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”, desta forma o resultado de nossos estudos é apenas mais uma cooperação aos muitos esforços já dedicados anteriormente. Isto leva a questionar-me: quanto deste trabalho é meu e quanto é dos outros? A pergunta cabe porque realmente sinto que este trabalho não é só meu. Pelos autores que li, pelos professores com quem tive aulas durante a graduação e pós-graduação, pelos colegas de mestrado que me fizeram aprender com as discussões e conversas, e pelos constantes comentários e sugestões feitos à minha dissertação.

Faço um agradecimento especial ao meu orientador, Miguel Noseda, que me aceitou como aluna de mestrado, confiou em meu trabalho sem nem ao menos me conhecer. Agradeço pela paciência, pelos ensinamentos, dicas de pesquisa, pelas horas de leituras gastas, e por ter assumido esta dissertação em um tema novo à seu grupo de pesquisa. Miguel, muito obrigada.

À professora Maria Eugênia, também por ter me acolhido no grupo, pelos ensinamentos transmitidos, pelos conselhos e conversas.

Minha família merece poucas palavras, mas aquelas que me são mais caras. Simplesmente obrigado por vocês existirem! Mãe, sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores da minha carreira profissional. Vó, seu saber e ensinamentos me fizeram a mulher de hoje, pode deixar que nunca esquecerei que a coragem é o melhor guia diante dos caminhos que a vida nos apresenta. Manos, Jefferson e Jeison, sei que mesmo longe esperam nada menos que o melhor de mim, sempre. Pai, apesar de todos os nossos desencontros, sei que torce por mim e se orgulha por minhas conquistas.

Ao Robson, meu companheiro, devo muito mais do que agradecimentos, devo parte desta conquista. Você é meu porto seguro. Obrigada pelo companheirismo, amizade, apoio, incentivo, compreensão e paciência. Por vezes você deve ter detestado a mim e minha ausência, no entanto procurou se aproximar de mim através da própria dissertação. Essa é mais uma etapa da vida que estamos construindo juntos. TE AMO.

À vida que me permitiu e me permite constantemente conhecer pessoas especiais.

Tati, Lou, Ju, vocês fizeram toda a diferença neste período, com certeza amigas, sem essa cumplicidade e carinho teria sido mais difícil. Tati, ao te conhecer acabei

ganhando um pacote completo: amiga, cúmplice, guia. Lou, você fez dos meus dias, dias mais bonitos, literalmente. Ju, suas idéias permearam meu trabalho, dividir as horas diurnas e noturnas de experimentos com você, fizeram elas parecerem menos cansativas.

Pri, aluna de iniciação científica (IC), obrigada por tudo. Obrigada pelo carinho, compreensão, pelos experimentos, e por me permitir mostrar a você um pouco do mundo da ciência. Não poderia deixar de mencionar os outros IC's do laboratório, Fifi e Ester. Nosso cotidiano é mais leve graças ao entusiasmo e a boa vontade de vocês.

Um obrigada especial à Pauline e Elaine, pelas inúmeras horas de conversas, compartilhamento de angústias, pelas risadas, pelo carinho, pela parceria, pelos auxílios, enfim, por tudo o que compartilhamos durante este período e que ainda compartilharemos.

Seria injusto não citar os amigos de sempre. Cris, Carlos e Any, amigos estes imprescindíveis na vida de qualquer ser humano. Ale, Marcela, Mari e Cassi vocês são as irmãs que a vida permitiu que eu escolhesse, são a prova de que amizade não é sinônimo de estar sempre juntas. Arianni, sua companhia faz falta nas noites de segundas e terças. Aos amigos de longe, espalhados por diversos lugares, que sempre estão na torcida pelo meu sucesso e acreditam que posso sempre mais. Todos vocês moram eternamente no meu coração.

Aos colegas e amigos de laboratório, obrigada pela convivência agradável, auxílio no dia-a-dia, momentos de descontração e conversas.

Aos colegas de laboratórios vizinhos pela convivência agradável e casuais empréstimos de materiais.

Aos colegas da turma de mestrado e doutorado, que ingressaram no programa em 2010, pela convivência maravilhosa durante o cumprimento dos créditos.

Ao pessoal do laboratório de fisiologia pela compreensão durante as inúmeras horas de equipamento utilizadas.

Ao Prof. Miguel, Prof. Guilherme, Prof. Diogo, Luciana, Arquimedes e Tatiane pelas análises de RMN.

À Eliz, Pauline, Larry e Rogério pelas análises de HPSEC-MALLS-RID.

À Rosane pelas análises em CLG.

Ao curso de pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Ao Programa REUNI, CAPES e PRONEX Carboidratos pelo apoio financeiro.

Há muito mais a quem agradecer... À todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, que foram importantes para a realização deste trabalho, o meu reconhecido e carinhoso MUITO OBRIGADA!!!

“A inteligência é feita por um terço de instinto, um terço de memória, e o último terço de vontade.”

Carlo Dossi

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de ligação *in vitro* à bactérias enteropatogênicas (*Salmonella sp.*) dos extratos nativos e quimiotransformados isolados de farelo de soja. Para obtenção dos extratos foram adotadas cinco estratégias de extração: estratégia 1 para obtenção de extratos nativos; estratégias 2 e 4 para obtenção de extratos quimiotransformados e estratégias 3 e 5 como controles das estratégias 2 e 4. Na estratégia 1 o farelo de soja foi submetido a extrações aquosas sequenciais (25 °C e 80 °C; 4 h). Nas estratégias 2 e 3, uma solução de farelo de soja teve seu pH ajustado para 2,0 e 7,0, respectivamente, e foi submetida à autoclavação (121 °C, 1 atm, 1 h). Após filtração, neutralização e centrifugação o sobrenadante obtido foi submetido à um novo processo de autoclavação (121 °C, 1 atm, 15 min). Nas estratégias 4 e 5, uma solução de farelo de soja teve seu pH ajustado para 2,0 e 7,0, respectivamente, e foi submetida à autoclavação (121 °C, 1 atm, 1 h). Após filtração, neutralização e centrifugação o sobrenadante obtido foi submetido à um novo processo de autoclavação (121 °C, 1 atm, 15 min). A solução final foi então tratada com TCA 80% (p/v) e em seguida os polissacarídeos foram precipitados com etanol. As extrações aquosas à 25 e 80 °C (Estratégia 1) não foram eficientes para a extração de polissacarídeos. As frações obtidas a partir desta estratégia são compostas por alto teor de proteínas (66,0 – 87,2%) e baixos teores de carboidratos (3,6 – 8,2%), com exceção da fração FS-1, a qual apresentou o maior teor de carboidratos (42,5%), sendo estes oligossacarídeos, majoritariamente sacarose. A estratégia 2 originou um polissacarídeo quimiotransformado, inédito na natureza, uma β -galactana, composta principalmente por unidades de β -D-Galp-(1→4)-ligadas. Os polímeros extraídos com as estratégias 3 e 5, estratégias controle, são constituídos de um polissacarídeo do tipo pectina com unidades de α -D-GalpA-(1→4)-ligadas e cadeias laterais de α -L-Araf-(1→5)-ligadas e β -D-Galp-(1→4)-ligadas, confirmando que a condição de extração utilizada para estratégia 2 é capaz que quimiotransformar a estrutura polissacarídica nativa. As frações obtidas da estratégia 4 apresentam alto conteúdo de ácido galacturônico, galactose, xilose, arabinose e ramnose, o que sugere a presença de pectinas. Os diversos extratos obtidos das diferentes estratégias de extração foram avaliados quanto a sua capacidade de ligação à bactérias enteropatogênicas (*Salmonella sp.*). Os resultados obtidos foram comparados aos do produto comercial hoje existente (BioMos[®]). Os extratos nativos (estratégia 1) diferenciaram-se significativamente do produto comercial, apresentando resultados até 3000% maiores. As frações obtidas das estratégias 2 e 3 apresentaram capacidade de ligação semelhante ao produto comercial, mostrando-se como potenciais substitutos. A capacidade de ligação evidenciada para soja é dita comumente como resultado da presença de manose e sua respectiva ligação às lectinas da bactéria. No entanto os teores de manose determinados no presente trabalho são baixos (0 – 2,3%) o que pode indicar que as proteínas também possam estar envolvidas no processo de ligação. Estes resultados demonstram o potencial uso biotecnológico do farelo de soja.

Palavras-chave: Farelo de soja. Polissacarídeos de soja. Enterobactérias. Capacidade de ligação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the capability of native and chemotransformed extracts from soybean meal to selectively bind *in vitro* enteropathogenic bacteria (*Salmonella* sp.). Five strategies were adopted in order to obtain the extracts: strategy 1 for obtaining native extracts; strategies 2 and 4 to obtain chemotransformed extracts and strategies 3 and 5 as control method for strategies 2 and 4. In strategy 1 the soybean meal was subjected to sequential aqueous extractions (25 °C and 80 °C; 4 h). In strategies 2 and 3, soybean meal solution had its pH adjusted to 2.0 and 7.0, respectively, and was subjected to autoclaving (121 °C, 1 atm, 1 h). After filtration, neutralization and centrifugation, the supernatant was subjected to a new process of autoclaving (121 °C, 1 atm, 15 min). In strategies 2 and 3, soybean meal solution had its pH adjusted to 2.0 and 7.0, respectively, and was subjected to autoclaving (121 °C, 1 atm, 1 h). After filtration, neutralization and centrifugation, the supernatant was subjected to a new process of autoclaving (121 °C, 1 atm, 15 min). The final solution was then treated with 80% TCA (w/v) and then the polysaccharides were precipitated with ethanol. The aqueous extractions at 25 and 80 °C (Strategy 1) were not efficient for polysaccharides extraction. Fractions obtained from this strategy are composed of high protein content (66,7 - 87.2%) and low carbohydrates content (3.6 – 8.2%), with the exception of fraction FS-1, which had the highest carbohydrate content (42.5%), as oligosaccharides, mainly sucrose. Strategy 2 resulted in a chemotransformed polysaccharide, not found in nature, a β -galactan, mainly composed by β -D-Galp-(1→4)-linked units. The polymers extracted with strategies 3 and 5, control strategies, are made up of a pectin-type polysaccharide with (1→4)-linked- α -D-GalpA units as main chain and (1→5)-linked- α -L-Araf and (1→4)-linked- β -D-Galp side chains, confirming that the extraction condition used for strategy 2 is able to chemotransform this polysaccharide structure. The fractions obtained from the strategy 4 have a high content of galacturonic acid, galactose, xylose, arabinose and rhamnose, which suggests the presence of pectins. The various extracts from different extraction strategies were evaluated for their ability to bind to enteropathogenic bacteria (*Salmonella* sp.). The results were compared to those of current commercial product (BioMos®). The native extracts (Strategy 1) differed significantly from the commercial product, with results up to 3000% higher. Fractions obtained from strategies 2 and 3 showed similar binding capacity to the commercial product, appearing as potential replacements. The binding capacity shown for soybeans is commonly said as a result of the presence of mannose and their respective binding to bacteria surface lectins. However the levels of mannose determined in this study are low (0 - 2.3%) which may indicate that the proteins may also be involved in the binding process. These results demonstrate the biotechnological potential use of soybean meal.

Key words: Soybean meal; Soybean polysaccharide; Enterobacteria; Binding capacity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	DIFUSÃO DA SOJA NO BRASIL.....	23
FIGURA 2 -	EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE SOJA NO MUNDO	24
FIGURA 3 -	RECEITAS DO COMPLEXO SOJA E PARTICIPAÇÃO DO COMPLEXO SOJA NAS RECEITAS	25
FIGURA 4 -	MODELO DE ESTRUTURA QUÍMICA DO SSPS.....	31
FIGURA 5 -	ESTRUTURA DO POLISSACARÍDEO OBTIDO DE EXTRAÇÃO ALCALINA DE FARELO DE SOJA	32
FIGURA 6 -	ESTRUTURA DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DA CASCA DA SOJA.....	32
FIGURA 7 -	MODELO DE ESTRUTURA DA ARABINOGALACTANA TIPO I ISOLADA DE FARELO DE SOJA.....	33
FIGURA 8 -	FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE SALMONELOSE	36
FIGURA 9 -	MECANISMOS ANTI-ADESÃO	42
FIGURA 10 -	ESTRATÉGIAS DE EXTRAÇÃO	46
FIGURA 11 -	ESTRATÉGIA 1 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS NATIVOS DO FARELO DE SOJA	48
FIGURA 12 -	ESTRATÉGIA 2 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DO FARELO DE SOJA.....	49
FIGURA 13 -	ESTRATÉGIA 3 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DO FARELO DE SOJA.....	50
FIGURA 14 -	ESTRATÉGIA 4 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DO FARELO DE SOJA.....	51
FIGURA 15 -	ESTRATÉGIA 5 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DO FARELO DE SOJA.....	53
FIGURA 16 -	ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO	63
FIGURA 17 -	ESPECTROS DE RMN ¹³ C DOS EXTRATOS NATIVOS OBTIDOS DA ESTRATÉGIA 1 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA.....	68

FIGURA 18 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE CARBOIDRATOS (110 – 55 PPM) DOS ESPECTROS DE RMN ¹³ C DA FRAÇÃO FS-1 OBTIDA NA ESTRATÉGIA 1 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA E DO PADRÃO DE SACAROSE. EM DETALHE, REGIÕES DE –CH ₂ DO ESPECTRO DE DEPT 135.....	69
FIGURA 19 - ESTRUTURA DA SACAROSE	70
FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES FS-1 E FS-E1 OBTIDAS DA ESTRATÉGIA 1 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA.....	71
FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES FS-1, FS-1d E ÁGUA DA DIÁLISE DE FS-1d.....	74
FIGURA 22 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO FS-1	76
FIGURA 23 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO FS-1d.....	76
FIGURA 24 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES FS-1, FS-1d EM COMPARAÇÃO COM PADRÃO DE SACAROSE	77
FIGURA 25 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO FS-1Ts	77
FIGURA 26 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA ESTRATÉGIA 2 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA.....	81
FIGURA 27 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA ESTRATÉGIA 3 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA.....	81
FIGURA 28 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-A e EAF-N.....	82
FIGURA 29 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-A E EAF-ATs.....	85
FIGURA 30 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-N E EAF-NTs	86
FIGURA 31 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-A E EAF-Ate.....	89
FIGURA 32 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-N E EAF-Nte	89
FIGURA 33 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-A; EAF-ATs E EAF-Ate.....	91
FIGURA 34 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-N E EAF-NTs.....	92
FIGURA 35 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-A, EAF-A1Ep e EAF-A2Ep	97

FIGURA 36 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-A1Es e EAF-A2Es	98
FIGURA 37 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-N, EAF-N1Ep e EAF-N2Ep.....	99
FIGURA 38 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-N1Es e EAF-N2Es	100
FIGURA 39 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS- RID) DA FRAÇÃO EAF-A1Ep.....	101
FIGURA 40 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS- RID) DA FRAÇÃO EAF-A2Ep.....	102
FIGURA 41 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS- RID) DA FRAÇÃO EAF-N1Ep.....	103
FIGURA 42 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS- RID) DA FRAÇÃO EAF-N2Ep.....	103
FIGURA 43 - MECANISMOS DE LIGAÇÃO CRUZADA DE MOLÉCULAS DE PECTINAS DE BAIXA ESTERIFICAÇÃO NA PRESENÇA DE CÁLCIO.....	104
FIGURA 44 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-A1Ep e EAF-A1Cs	106
FIGURA 45 - FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO EAF-A1Ep POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA.....	107
FIGURA 46 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-A1Ep e EAF-A1-0,5	108
FIGURA 47 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE EAF-A1Ep EM SEPHAROSE 6B.....	109
FIGURA 48 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES EAF-A1Ep, EAF-A1EpA-D.....	110
FIGURA 49 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS- RID) DA FRAÇÃO EAF-A1EpA.....	112
FIGURA 50 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS- RID) DA FRAÇÃO EAF-A1EpB.....	113
FIGURA 51 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS- RID) DA FRAÇÃO EAF-A1EpC.....	113
FIGURA 52 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS- RID) DA FRAÇÃO EAF-A1EpD.....	114

FIGURA 53 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO (EAF-A1EpA, EAF-A1EpB, EAF-A1EpC, EAF-A1EpD) EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO EAF-A1Ep	115
FIGURA 54 - <i>SCREENING</i> INICIAL DAS AMOSTRAS UTILIZADO PARA O TESTE DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO	119

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CONTROLES DE CRESCIMENTO, DILUIÇÃO EM SÉRIE DE <i>Salmonella typhimurium</i>	118
GRÁFICO 2 - REGRESSÃO LINEAR PARA <i>Salmonella typhimurium</i> . TEMPO DE DETEÇÃO EM HORAS QUANDO O CRESCIMENTO BACTERIANO ATINGE DENSIDADE ÓPTICA DE 0,1.....	118
GRÁFICO 3 - PERCENTAGEM DE LIGAÇÃO EM RELAÇÃO AO BIOMOS [®] DAS FRAÇÕES TESTADAS NO <i>SCREENING</i> INICIAL.....	121
GRÁFICO 4 - CAPACIDADE DE LIGAÇÃO (UFC.mL ⁻¹) DAS FRAÇÕES TESTADAS NO <i>SCREENING</i> INICIAL.....	121
GRÁFICO 5 - CURVAS DE CRESCIMENTO.....	124

LISTA DE TABELA

TABELA 1 -	EXPORTAÇÕES DO COMPLEXO SOJA, PREVISÃO PARA A SAFRA DE 2009/2010	25
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO APROXIMADA DO GRÃO DE SOJA	26
TABELA 3 -	ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS EXTRATOS NATIVOS OBTIDOS	66
TABELA 4 -	ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVAS E APÓS TRATAMENTO COM TCA	72
TABELA 5 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO NATIVA E APÓS DIÁLISE	73
TABELA 6 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS ESTRATÉGIAS 2 E 3	79
TABELA 7 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS NAS ESTRATÉGIAS 2 E 3 E APÓS TRATAMENTO COM TCA	84
TABELA 8 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS NAS ESTRATÉGIAS 2 E 3 E APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO	87
TABELA 9 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS ESTRATÉGIAS 4 E 5	95
TABELA 10 -	ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS ESTRATÉGIAS 4 E 5	96
TABELA 11 -	QUANTIDADE DE BACTÉRIA LIGADA POR 3 MG DA FRAÇÃO TESTADA	123
TABELA 12 -	ANÁLISES QUÍMICAS, COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E NÚMERO DE BACTÉRIAS ADERIDAS DAS FRAÇÕES TESTADAS QUANTO A SUA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO	128

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIOVE	- Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais
AgNO ₃	- Nitrato de prata
ANOVA	- Análise de variância
AU	- Ácido urônico
BHI	- Brain Heart Infusion
BSA	- Albumina de soro bovino
CaCl ₂	- Cloreto de cálcio
CDC	- Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CHO	- Carboidratos
Cl ⁻	- Íons cloreto
CLG	- Cromatografia líquida-gasosa
D ₂ O	- Água deuterada
DEAE-Sephacel	- Matriz de troca aniônica fraca a base de celulose sendo que o grupo trocador é o dietilaminoetil
DEPT	- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	- Dimetilsulfóxido
<i>dn/dc</i>	- Variação do índice de refração em relação à concentração
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DTA	- Doenças transmitidas por alimentos
EAF-A	- Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 2
EAF-A*	- Fração obtida a partir da Estratégia 2 onde a etapa de sonicação foi excluída durante o ensaio de capacidade de ligação
EAF-A1-0,5	- Fração eluída com NaCl 0,5 M durante o fracionamento cromatográfico da fração EAF-A1Ep em DEAE-Sephacel
EAF-A1-1,0	- Fração eluída com NaCl 1,0 M durante o fracionamento cromatográfico da fração EAF-A1Ep em DEAE-Sephacel
EAF-A1-1,5	- Fração eluída com NaCl 1,5 M durante o fracionamento cromatográfico da fração EAF-A1Ep em DEAE-Sephacel
EAF-A1Ep; EAF-A2Ep- EAF-A1EpA – D	- Frações polissacarídicas obtidas a partir da estratégia 4 - Frações obtidas durante o fracionamento cromatográfico da fração EAF-A1Ep em Sepharose 6B
EAF-A1Es; EAF-A2Es	- Frações etanólicas obtidas a partir da Estratégia 4
EAF-A1Cp	- Fração insolúvel obtida após tratamento de EAF-A1Ep com CaCl ₂
EAF-A1Cs	- Fração solúvel obtida após tratamento de EAF-A1Ep com CaCl ₂
EAF-A1Tp; EAF-A2Tp	- Frações insolúveis obtidas após tratamento com TCA na Estratégia 4
EAF-A1-w	- Fração eluída com água durante o fracionamento cromatográfico da fração EAF-A1Ep em DEAE-Sephacel
EAF-AP	- Fração insolúvel obtida a partir da estratégia 2
EAF-AR	- Resíduo retido em tecido fino após processo de filtração (Estratégia 2)
EAF-Ate	- Fração obtida após tratamento de EAF-A com Pronase E

EAF-ATp	- Fração insolúvel obtida após tratamento de EAF-A com TCA 80% (p/v)
EAF-ATs	- Fração solúvel obtida após tratamento de EAF-A com TCA 80% (p/v)
EAF-N	- Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 3
EAF-N*	- Fração obtida a partir da Estratégia 3 onde a etapa de sonicação foi excluída durante o ensaio de capacidade de ligação
EAF-N1Ep; EAF-N2Ep	- Frações polissacarídicas obtidas a partir da estratégia 5
EAF-N1Es; EAF-N2Es	- Frações etanólicas obtidas a partir da Estratégia 5
EAF-N1Tp; EAF-N2Tp	- Frações insolúveis obtidas após tratamento com TCA na Estratégia 5
EAF-NP	- Fração insolúvel obtida a partir da estratégia 3
EAF-NR	- Resíduo retido em tecido fino após processo de filtração (Estratégia 3)
EAF-Nte	- Fração obtida após tratamento de EAF-N com Pronase E
EAF-NTp	- Fração insolúvel obtida após tratamento de EAF-N com TCA 80% (p/v)
EAF-NTs	- Fração solúvel obtida após tratamento de EAF-N com TCA 80% (p/v)
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	- Estados Unidos da América
Fru	- Frutose
FS	- Farelo de soja
FS-1*	- Fração obtida a partir da Estratégia 1 onde a etapa de sonicação foi excluída durante o ensaio de capacidade de ligação
FS-1; FS-2	- Frações obtidas por extrações aquosas a 25 °C (Estratégia 1)
FS-1d	- Fração retida após diálise de FS-1 em membrana de 2kDa
FS-1te	- Fração obtida após tratamento de FS-1 com Pronase E
FS-1Tp	- Fração insolúvel obtida após tratamento de FS-1 com TCA 80% (p/v)
FS-1Ts	- Fração solúvel obtida após tratamento de FS-1 com TCA 80% (p/v)
FS-3; FS-4	- Frações obtidas por extrações aquosas a 80 °C (Estratégia 1)
FS-E1; FS-E2	- Frações etanólicas obtidas por extração aquosa a 25 °C (Estratégia 1)
FS-E3; FS-E4	- Frações etanólicas obtidas por extração aquosa a 80 °C (Estratégia 1)
FS-R	- Resíduo final obtido após as extrações sequenciais da Estratégia 1
Fuc	- Fucose
Gal	- Galactose
GalA	- Ácido galacturônico
Glc	- Glucose
HCl	- Ácido clorídrico
HPSEC-MALLS-RID	- Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) acoplada a detector de índice de refração (RID)

diferencial e espalhamento de luz em multiângulos (MALLS)

IAC	- Instituto Agronômico de Campinas
IgA	- Imunoglobulina A
Man	- Manose
MOS	- Manoligossacarídeos
M_w	- Massa molecular ponderal média
NaBH_4	- Boroidreto de sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
NaN_3	- Azida sódica
NaNO_2	- Nitrito de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
OD	- Densidade óptica
p.e.	- Por exemplo
PBS	- Tampão fosfato de sódio
ppm	- Partes por milhão
PPT	- Precipitado
PTN	- Proteínas
qsp	- Quantidade suficiente para
Rha	- Ramnose
RMN	- Ressonância magnética nuclear
rpm	- Rotações por minuto
RS	- Rio Grande do Sul
SOB	- Sobrenadante
SP	- São Paulo
SVS	- Secretaria de vigilância em saúde
TCA	- Ácido tricloroacético
TFA	- Ácido trifluoroacético
TSB	- Tryptic Soy Broth
UFC	- Unidades formadoras de colônia
Xil	- Xilose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 SOJA.....	22
2.1.1 Origem e Difusão da Cultura da Soja.....	22
2.1.2 A Soja e a Economia.....	23
2.1.3 Composição da Soja.....	25
2.1.4 Usos da Soja.....	26
2.2 FARELO DE SOJA.....	27
2.3 POLISSACARÍDEOS DE SOJA.....	29
2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS DE SOJA.....	33
2.4.1 CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DE BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS.....	35
2.4.1.1 Mecanismo de adsorção de enterobactérias.....	38
2.4.1.1.1 Processo de adesão.....	38
2.4.1.1.1.1 Fímbrias.....	39
2.4.1.1.2 Mecanismo anti-adesão.....	40
2.4.1.2 Ensaio <i>in vitro</i> de adsorção de enterobactérias.....	42
3 JUSTIFICATIVA	44
4 OBJETIVOS	45
4.1 OBJETIVO GERAL.....	45
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
5 MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1 MATERIAL.....	46
5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	46
5.2.1 Estratégia 1.....	47
5.2.2 Estratégia 2.....	48
5.2.3 Estratégia 3.....	49
5.2.4 Estratégia 4.....	50
5.2.5 Estratégia 5.....	52
5.3 PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS.....	53
5.3.1 Diálise fechada.....	53
5.3.2 Tratamento com TCA.....	54
5.3.3 Tratamento enzimático.....	54
5.3.4 Tratamento com CaCl ₂	55
5.3.5 Cromatografia de Troca Aniônica.....	55
5.3.6 Cromatografia de Exclusão.....	55
5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E DAS FRAÇÕES.....	56
5.4.1 Métodos Colorimétricos.....	56
5.4.1.1 Dosagem de Açúcares Totais.....	56
5.4.1.2 Dosagem de Proteínas.....	57
5.4.1.3 Dosagem de Ácidos Urônicos.....	57
5.4.2 Determinação da Composição Monossacarídica.....	57
5.4.3 Métodos Cromatográficos.....	58
5.4.3.1 Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG).....	58
5.4.4 Método Espectroscópico.....	59
5.4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear.....	59
5.5 ESTUDOS BIOLÓGICOS <i>In Vitro</i>	60

5.5.1 Ensaio de capacidade de ligação	60
5.5.1.1 Bactérias	60
5.5.1.2 Curva padrão.....	60
5.5.1.3 Amostras	61
5.5.1.4 Análise Estatística	62
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS EXTRATOS AQUOSOS DO FARELO DE SOJA	64
6.1.1 Estratégia 1 – Extratos Nativos	64
6.1.1.1 Extração e Obtenção dos Extratos.....	64
6.1.1.2 Análises Químicas e de Composição Monossacarídica.....	65
6.1.1.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear	66
6.1.1.4 Purificação da fração FS-1	71
6.1.1.4.1 Tratamento com TCA	71
6.1.1.4.2 Diálise em sistema fechado.....	73
6.1.1.4.3 Tratamento enzimático	74
6.1.1.5 Análise por HPSEC-MALLS-RID	75
6.1.2 Estratégia 2 e 3 – Polissacarídeos Quimiotransformados	77
6.1.2.1 Extração e Obtenção dos Polissacarídeos.....	77
6.1.2.2 Análises Químicas e de Composição Monossacarídica das frações obtidas	78
6.1.2.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear	80
6.1.2.4 Purificação das frações EAF-A e EAF-N	83
6.1.2.4.1 Tratamento com TCA	83
6.1.2.4.2 Tratamento Enzimático.....	86
6.1.2.5 Análise por HPSEC-MALLS-RID	90
6.1.3 Estratégia 4 e 5 – Polissacarídeos Quimiotransformados	92
6.1.3.1 Extração e Obtenção dos Polissacarídeos.....	92
6.1.3.2 Análises Químicas e de Composição Monossacarídica	94
6.1.3.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear	96
6.1.3.4 Análise por HPSEC-MALLS-RID	100
6.1.3.5 Purificação e fracionamento da fração EAF-A1Ep	103
6.1.3.5.1 Tratamento com CaCl ₂	104
6.1.3.5.2 Fracionamento por Cromatografia de Troca Aniônica.....	106
6.1.3.5.3 Fracionamento por Cromatografia de Exclusão	108
6.2 ESTUDOS BIOLÓGICOS <i>In Vitro</i>	115
6.2.1 Ensaio de capacidade de ligação	115
6.2.1.1 Curva Padrão	117
6.2.1.2 Amostras	118
6.2.1.2.1 Curvas de crescimento.....	122
6.2.1.2.2 Mecanismos de ligação	127
7. CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS.....	133

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é mundialmente o segundo maior produtor de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (EMBRAPA, 2011a). No ano de 2010 estima-se que o “Complexo Soja” (grãos, farelo e sementes de soja) injetou na economia, somente com exportações, mais de 17 bilhões de reais (ABIOVE, 2011).

A soja é um grão altamente versátil, originando produtos e subprodutos utilizados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Seu uso mais conhecido é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto (EMBRAPA, 2011a). O produto resultante da extração mecânica e/ou química do óleo dos grãos de soja é conhecido por farelo de soja que, muitas vezes, não é aproveitado pelas empresas (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998).

O elevado teor em proteínas em sua composição (aproximadamente 50%) faz do farelo de soja a principal matéria prima na fabricação de rações para alimentação de animais. Quase 70% do farelo protéico das rações que alimentam os animais domésticos vêm da soja (EMBRAPA, 2011b). Embora grande parte deste resíduo seja destinada a rações animais, diversas pesquisas e processos têm sido desenvolvidos com o intuito de obter produtos refinados, com um maior valor agregado (STRÖHER, 2010).

Carboidratos de soja são o segundo maior componente depois das proteínas indicando um importante valor econômico para a indústria da soja (BAINY *et al.*, 2008). Polissacarídeos de diversas origens podem atuar como agentes anti-adesão de enterobactérias (OFEK; HASTY; SHARON, 2003), traduzindo-se como uma alternativa ao exaustivo uso de antibióticos na agropecuária. A exemplo disso, trabalhos envolvendo leite e seus componentes (MARTÍN; MARTÍN-SOSA; HUESO, 2002; MARTÍN-SOSA; MARTÍN; HUESO, 2002), soja (KIERS *et al.*, 2002; BECKER *et al.*, 2007; BECKER; GALLETI, 2008), oxicoco (*cranberry*) (BURGUER *et al.*, 2000), cenoura, café, manga (BECKER *et al.*, 2007; BECKER; GALLETI, 2008) demonstram, através de experimentos *in vitro*, a capacidade destes alimentos em adsorver enterobactérias evitando o processo de colonização bacteriana.

Dentro dessa perspectiva, existe um crescente interesse comercial focando o farelo de soja para usos biológicos, devido a sua grande disponibilidade e baixo custo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SOJA

2.1.1 Origem e Difusão da Cultura da Soja

O centro de origem da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a China, onde é cultivada há mais de cinco mil anos, desempenhando papel importante na estabilidade do desenvolvimento e nutrição do povo chinês (EMBRAPA, 2011c; JOHNSON; WHITE; GALLOWAY, 2008; LIU, 1999).

A partir da China, a soja se expandiu para outros países do Oriente, e depois Ocidente, sendo introduzida na Europa apenas em 1712. Data de 1804 o primeiro relato da cultura da soja na América, porém seu cultivo em larga escala iniciou-se, nos Estados Unidos da América (EUA), apenas por volta de 1920 (LIU, 1999; ALMEIDA, 2010).

No Brasil, a soja foi introduzida na Bahia, em 1882, quando os primeiros estudos de avaliação de cultivares foram realizados. Nessa época a soja era estudada principalmente com o objetivo de uma cultura forrageira, e não como planta produtora de grãos para a indústria de farelos e óleos vegetais (EMBRAPA, 2011c).

Alguns anos mais tarde, em 1900 e 1901, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) localizado em São Paulo (SP), promoveu aos produtores paulistas a primeira distribuição de sementes de soja. Têm-se registros, por volta desta mesma data, do primeiro plantio de soja no Rio Grande do Sul (RS), onde a cultura encontrou semelhanças climáticas do ecossistema de origem dos materiais genéticos (EUA) para se desenvolver e expandir (EMBRAPA, 2011c; ASSUMPÇÃO, 2008). Em 1914, no RS, começou a ser produzida como cultura de verão nas áreas de cultivo de trigo (EMBRAPA, 2011c).

Em meados dos anos 50, intensificaram-se as pesquisas e as exportações, devido ao grande sucesso que a cultura teve no sul do país. Esse sucesso é decorrência da soja ser a melhor alternativa de verão em sucessão ao trigo plantado

no inverno, tanto do ponto de vista técnico quanto econômico, tendo mercado de exportação assegurado pelo fato da colheita coincidir com a entressafra dos estados norte-americanos (EMBRAPA, 2011a).

Inicialmente a produção estava concentrada na região Sul e através de pesquisas realizadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Nas décadas de 70 e 80, a cultura foi expandida para as regiões do Brasil Central, graças ao desenvolvimento de cultivares adaptadas à região (OLIVEIRA, 2009; EMBRAPA, 2011c). Hoje a soja já é absorvida em grande parte do Brasil, como pode ser observado na Figura 1 (AGNOL, 2011).

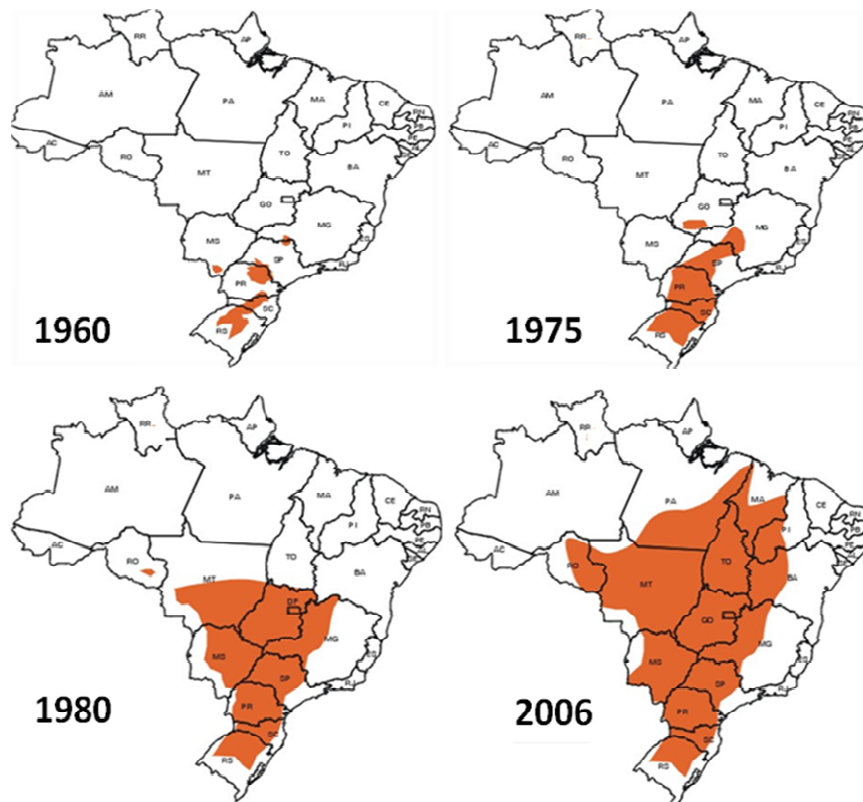


FIGURA 1 - DIFUSÃO DA SOJA NO BRASIL
 FONTE: AGNOL (2011)

2.1.2 A Soja e a Economia

A soja é amplamente cultivada em vários países do mundo, sendo responsável pelo rendimento de US\$ 215 bilhões/ano (WYSMIERSKI; VELLO, 2010). Os principais produtores mundiais são os Estados Unidos com uma produção

de 91 milhões de toneladas na safra 2010, seguido pelo Brasil e Argentina, que na mesma safra, produziram 69 e 54 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2011; EMBRAPA, 2011a; IBGE, 2011). Os três países são responsáveis por mais de 80% da produção mundial (Figura 2).

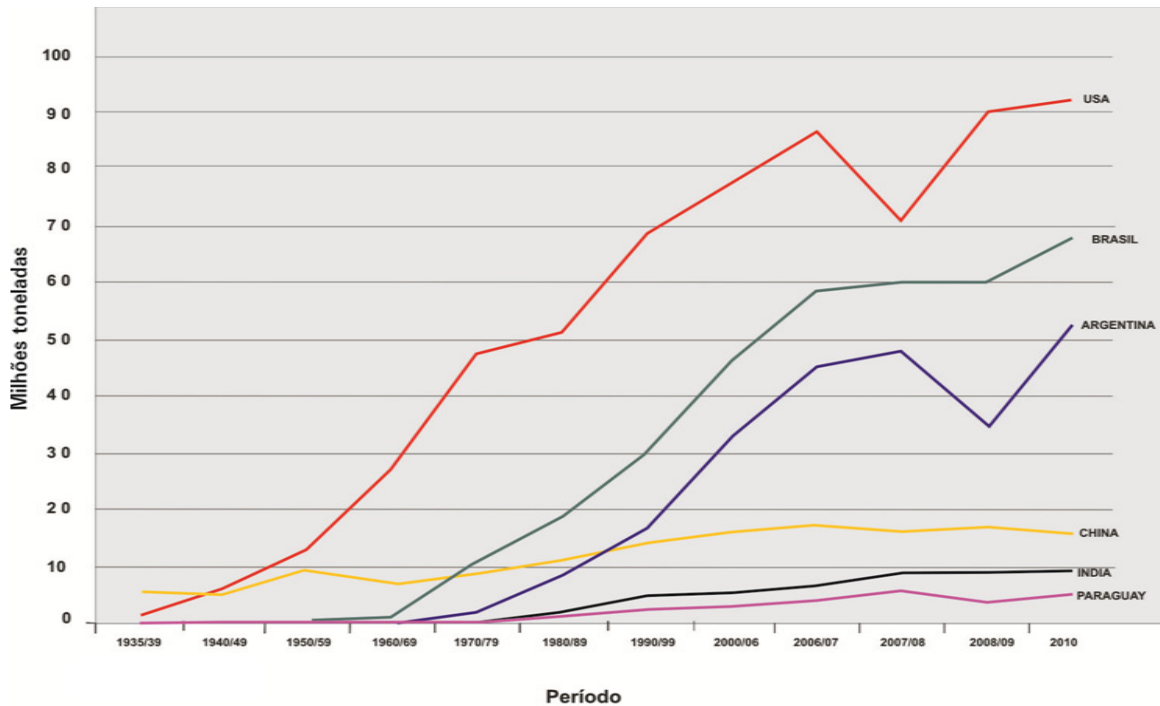


FIGURA 2 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE SOJA NO MUNDO
 FONTE: AGNOL (2011)

Os maiores produtores de soja no Brasil são os estados do Mato Grosso e Paraná com produções, em 2010, de 20,4 e 15,4 milhões de toneladas, respectivamente (EMBRAPA, 2011b).

A soja brasileira é destinada à produção de grãos, farelo, óleo e sementes, formando o chamado “Complexo Soja”, responsável por 8,5% do total das exportações, onde em 2010 injetou US\$ 17,1 bilhões na economia brasileira apenas como resultado das exportações, onde US\$ 4,1 bilhões foram com farelo de soja (ABIOVE, 2011; MDIC, 2011; EMBRAPA, 2011c). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE) a estimativa para a próxima safra é de que o volume total de soja e derivados que será exportado ultrapasse 44 milhões de toneladas, conforme demonstrado na Tabela 1 e ilustrado na Figura 3 (ABIOVE, 2011).

TABELA 1 - EXPORTAÇÕES DO COMPLEXO SOJA, PREVISÃO PARA A SAFRA DE 2009/2010

2011 (Previsão)	Volume (1000 ton)	Valor (US\$/ton)	Valor (US\$ milhões)
Soja em Grão	29073	380	11043
Farelo de Soja	13669	345	4719
Óleo de Soja	1564	865	1352
Total	44306		17115

FONTE: ADAPTADO DE ABIOVE (2011)

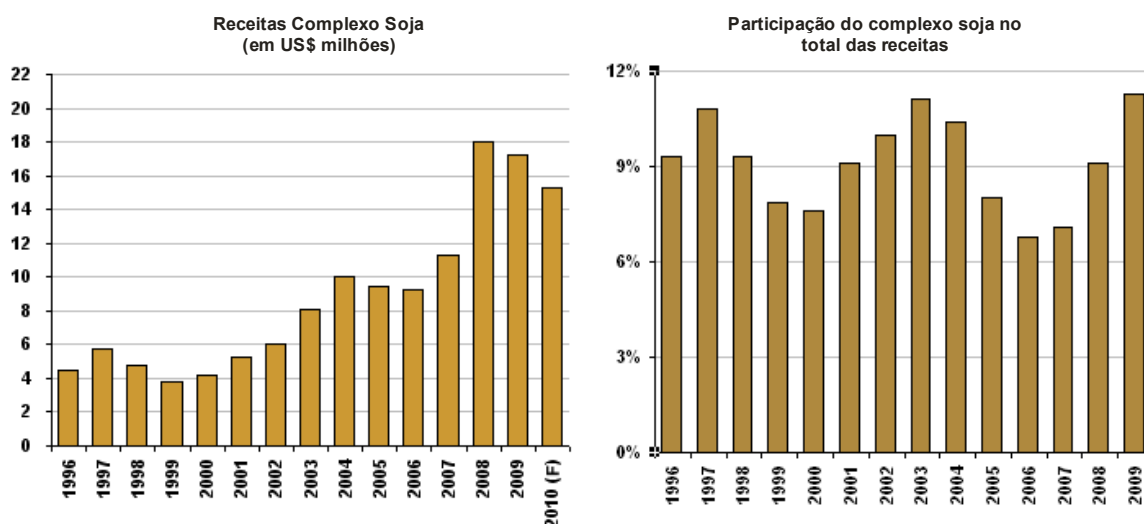


FIGURA 3 - RECEITAS DO COMPLEXO SOJA E PARTICIPAÇÃO DO COMPLEXO SOJA NAS RECEITAS

FONTE: ADAPTADO DE ABIOVE (2011)

2.1.3 Composição da Soja

A soja, é uma espécie herbácea, cuja posição taxonômica se insere na subdivisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, divisão Magnoliophyta classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae e ao gênero *Glycine*, que compreende várias espécies, sendo a comercial a *Glycine max* (L.) Merrill (CARLSON, 1973 apud MAGALHÃES, 2002; CARUSO, 1997 apud BORRMANN, 2009).

A composição média em base seca do grão de soja está demonstrada na Tabela 2. O teor dos compostos sofrem influência de fatores tais como cultivar, época do plantio, localização geográfica e estresse ambiental, o que os tornam bastante variáveis (LIU, 1999).

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO APROXIMADA DO GRÃO DE SOJA

Parte do Grão	% do grão	Composição Química (% peso seco)			
		Proteínas	Lipídios	Carboidratos	Outros*
Casca	8	9	1	86	4,3
Hipocótilo	2	41	11	43	4,4
Cotilédone	90	43	23	29	5,0
Total	100	40	20	35	5,0

* Minerais, vitaminas, fitatos e isoflavonas.

FONTE: LIU (1999)

A soja contém em média, 40% de proteínas e 20% de lipídeos o que a torna a cultura com o maior teor protéico e o segundo maior teor de gordura, superado somente pelo amendoim que possui 48% de lipídeos. A proteína da soja contém todos os aminoácidos essenciais. O óleo de soja contém uma alta proporção de ácidos graxos insaturados (80% do total de lipídeos) das séries ω -3 e ω -6, tais como ácido linoléico e linolênico (LIU, 1999; APROSOJA, 2010).

A soja possui em torno de 35% de carboidratos, sendo 2% deste valor encontrado sob a forma de amido. A parede celular da soja é composta de aproximadamente 30% pectinas, 50% hemicelulose e 20% celulose (LIU, 1999). Cerca de apenas 11% do total de carboidratos da soja corresponde a carboidratos solúveis (MAUGHAN; MAROOF; BUSS, 2000), sendo encontrados traços de monossacarídeos, como glucose e arabinose, e quantidades mensuráveis de di- e oligossacarídeos, como a sacarose (40 – 68% do total de carboidratos solúveis), estaquiose e rafinose (LIU, 1999; JOHNSON; WHITE; GALLOWAY, 2008).

A soja também contém, em menor quantidade, diversas outras substâncias, conhecidas como fitoquímicos, que têm sido correlacionadas nos últimos anos com benefícios únicos à saúde (LIU, 1999; MESSINA, 1999).

2.1.4 Usos da Soja

A soja é um grão altamente versátil o qual origina produtos e subprodutos utilizados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Ela entra na composição de alguns embutidos, chocolates e temperos. É também usada pela indústria de nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra. Sua proteína é base de ingredientes de padaria, massas,

produtos de carne, cereais, misturas preparadas, bebidas, alimentação para bebês e alimentos dietéticos (EMBRAPA, 2011a).

No entanto, seu uso mais conhecido é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Nesse processo, também é produzida a lecitina, um agente emulsificante usado na fabricação de salsichas, maioneses e achocolatados. Recentemente, a soja vem crescendo como fonte alternativa de combustível. O biodiesel de soja vem sendo testado por instituições de pesquisa, como a EMBRAPA (EMBRAPA, 2011a).

A soja também vem sendo estudada por seus benefícios na prevenção e no tratamento de doenças crônico-degenerativas. Estudos sugerem que o consumo regular de derivados de soja reduz a incidência de câncer de próstata (ZHOU *et al.*, 1999). Também é utilizada no tratamento de osteoporose (MESSINA, 1999) e sintomas associados à menopausa (FERRARI; DEMIATE, 2001), já que apresenta uma molécula com estrutura química semelhante ao estradiol (principal hormônio feminino). O consumo da proteína da soja também tem sido associado com a redução da hipercolesterolemia e do risco de complicações cardíacas (FUKUDA *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2007).

Jimenez-Escrig *et al.* (2008) demonstraram em seu trabalho o uso de resíduos, obtidos durante a extração do leite de soja, que possuem efeitos pré-bióticos e com alta capacidade antioxidante. Um estudo realizado por Plewa *et al.* (1999) demonstrou que o extrato alcoólico obtido de um subproduto do processamento da soja foi capaz de reprimir danos induzidos no DNA e mutações em células de mamíferos, sugerindo que os produtos e subprodutos comerciais da soja podem ser importantes fontes de novos quimioprotetores.

2.2 FARELO DE SOJA

Pichat (1995 apud RIBEIRO, 2006) define a palavra resíduo (do latim *residuum*) como toda substância que o produtor abandona ou que se encontra forçado a abandonar. Constantemente estudos são divulgados sobre as várias maneiras da utilização de resíduos agroindustriais, nos quais ao serem descartados, do processamento industrial de vegetais e beneficiamento de cereais, são

descartadas também porções potencialmente nutritivas, a exemplo do farelo de soja, que é rico em proteínas e carboidratos.

Dos resíduos de produtos industrializados à base de soja consumidos nos países asiáticos poucos são reaproveitados ou transformados. Já nos EUA, praticamente todo o resíduo de derivados da soja é processado, tornando-os subprodutos. Alimento a base de soja contém uma mistura complexa de compostos bioativos que agem por si só ou pela interação com outros compostos ou moléculas do organismo do indivíduo (LIMA, 2008).

Entende-se por farelo de soja o subproduto resultante da extração mecânica e/ou química do óleo dos grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) que, muitas vezes, não é aproveitado por empresas (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998). Seu preço varia em torno de R\$ 600/ton de farelo de soja, entre indústrias e cooperativas no Brasil. É um produto relativamente barato com grande potencial de uso como suplemento, fonte de nitrogênio, proteína, polissacarídeos ou substrato em processos biotecnológicos. A variação do preço é decorrente da disponibilidade e tipo de farelo (porcentagem de proteína) (ABIOVE, 2011).

O farelo representa em torno de 70% da semente de soja. Sua composição pode variar sendo aproximadamente 50% proteínas, 40% de carboidratos e 10% de cinzas e outros componentes (BAINY *et al.*, 2008). A fração de carboidratos inclui açúcares simples (monossacarídeos e dissacarídeos), oligossacarídeos e polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina e amido) (LIU, 1999). A composição química do farelo de soja pode apresentar variações devido a diferenças nas condições ambientais, variedades genéticas e condições de processamento (umidade, tempo e temperatura de secagem, tostagem) (STRÖHER, 2010).

O elevado teor em proteínas faz do farelo de soja a principal matéria prima na fabricação de rações para alimentação de animais. Quase 70% do farelo protéico das rações que alimentam os animais domésticos vêm da soja (EMBRAPA, 2011c). Embora grande parte deste resíduo seja destinada a rações animais, diversas pesquisas e processos têm sido desenvolvidos com o intuito de obter produtos refinados, com um valor agregado, destinados diretamente ao consumo humano ou à produção de ingredientes protéicos (STRÖHER, 2010).

2.3 POLISSACARÍDEOS DE SOJA

Os polissacarídeos são as biomoléculas mais abundantes da Terra, pois exercem várias funções em todos os seres vivos, sendo a principal prover energia. Polissacarídeos consistem em polímeros com mais de 20 unidades monossacarídicas, cujas cadeias podem ser lineares ou ramificadas (STRYER, 1996; NELSON; COX, 2006).

Os polissacarídeos, também chamados glicanas, diferem entre si na identidade das unidades monossacarídicas, nos tipos de ligação que as unem, no comprimento das cadeias, ou no grau de ramificação dessas cadeias. Homopolissacarídeos (amido, glicogênio, celulose, por exemplo) são formados por apenas um tipo de monossacarídeo, enquanto heteropolissacarídeos (peptidoglicanos, por exemplo) são formados por mais de um tipo de monossacarídeo (STRYER, 1996; NELSON; COX, 2006).

Carboidratos de soja são o segundo maior componente depois das proteínas indicando um importante valor econômico para a indústria de soja (BAINY *et al.*, 2008). Discrepâncias entre valores encontrados dos monossacarídeos obtidos a partir da soja são devido a diferença nos bioprodutos estudados e na variação da composição entre as variedades de soja (MATEOS-APARICIO *et al.*, 2010).

Segundo Aspinall (1988) os polissacarídeos da soja podem ser separados em uma maior fração não-celulósica e uma menor fração celulósica, sendo a fração não-celulósica constituída de polissacarídeos ácidos, arabinogalactanas e cadeias de arabinanas ou galactanas. Segundo Aspinall *et al.* (1967a), o principal açúcar ácido presente na soja é o ácido galacturônico. Esses polissacarídeos ácidos possuem então ácido D-galacturônico e L-ramnose na cadeia principal com cadeias laterais constituídas principalmente de unidades de galactose e arabinose (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998; FURUTA *et al.*, 1998).

Vários artigos demonstram a extração de polissacarídeos de soja. Alguns reportam a extração de polissacarídeos neutros com agentes quelantes (KAWAMURA; NARASAKI, 1961), extração alcalina à quente (LABAVITCH; FREEMAN; ALBERSHEIM, 1976), extração aquosa à quente (MORITA, 1965), ou ainda extração ácida à quente (FURUTA *et al.*, 1998). Em comum todos sugerem que os polissacarídeos de soja são compostos de arabinose, galactose e ácido

galacturônico. A presença desses monossacarídeos indicam uma considerável quantidade de pectinas (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998).

Bainy *et al.* (2008) encontrou teores de 45% de carboidratos para farelo de soja, sendo a galactose, arabinose e ácidos urônicos os monossacarídeos mais presentes. Glucose se encontrou em quantidades baixas, o que está em acordo com o trabalho de Huisman, Schols e Voragen (1998). Furuta *et al.* (1998), além de galactose, arabinose e ácidos urônicos encontraram a presença de manose em suas frações, o que é um indicativo de remoção incompleta das cascas da soja, uma vez que esta consiste em grandes extensões de galactomananas (WHISTLER; SAARNIO, 1957).

Dentre os polissacarídeos obtidos da soja, as arabinogalactanas têm sido estudadas intensamente (ASPINALL *et al.*, 1967a; ASPINALL *et al.*, 1967b; MORITA, 1965; LABAVITCH; FREEMAN; ALBERSHEIM, 1976) e mostrado conter cadeias principais de (1→4)-β-D-Galp, onde algumas unidades carregam em C-3 uma cadeia lateral de L-arabinofuranose (1→5)-ligada. No entanto, uma grande variação está presente no grau de ramificação e na distribuição dos substituintes na cadeia (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998). Aspinall e Cottrell (1971) isolaram uma arabinana altamente ramificada, contendo arabinofuranose (1→3) e (1→5)-ligada.

Liao *et al.* (2001) encontraram polissacarídeos de soja com características de α-D-glucanas. Sua cadeia central era formada por (1→6)-α-D-Glcp, com unidades de galactose e arabinose (1→3)- ou (1→4)-ligadas substituídas em C-3 ou C-4 nas unidades de glucose.

Fransen *et al.* (2000) isolam arabinogalactanas de farelo de soja com cadeias laterais substituídas em O-4 por resíduos de ramnose. Sua estrutura é formada por uma cadeia principal de galactanas β-(1→4)-ligada altamente ramificada com cadeias de arabinana. Em média, a cadeia de arabinogalactana contém 29 unidades de galactose e 25 unidades de arabinose.

Nakamura *et al.* (2001) isolaram, a partir de cotilédones de soja deslipidificados e desproteinizados, um polissacarídeo denominado pelos autores de Polissacarídeo Solúvel da Soja (SSPS). A estrutura detalhada do SSPS foi determinada por degradação enzimática (Figura 4). As moléculas são polissacarídeos ácidos contendo 18% de ácido galacturônico (NAKAMURA *et al.*,

2002b). A cadeia principal consiste em galacturonana (GN), composta de $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow)]$ e ramnogalacturonana (RG), composta de unidades repetidas de diglicosil $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha(1}\rightarrow)]$. O grau de polimerização de GN é estimado em cerca de 4-10 resíduos de GalA, com 15, 28 e 100 de unidades de repetição de GalA-Rha (NAKAMURA *et al.*, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2002b). As cadeias laterais de $(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-galactanas}$, cujo grau de polimerização é estimado em cerca de 43-47, são ramificadas com resíduos de fucose e arabinose; e as cadeias laterais de $(1\rightarrow 3)$ e $(1\rightarrow 5)\text{-}\alpha\text{-arabinanas}$, estão ligadas ao C-4 dos resíduos de ramnose nas regiões RG. Alguns ácidos galacturônicos são modificados em C-3 por oligossacarídeos xilosil (grau de polimerização = 4 ou 7), que são compostos de xilose $\beta\text{-1,4-}$ e $\beta\text{-1,2-}$ ligada (NAKAMURA *et al.*, 2002a).

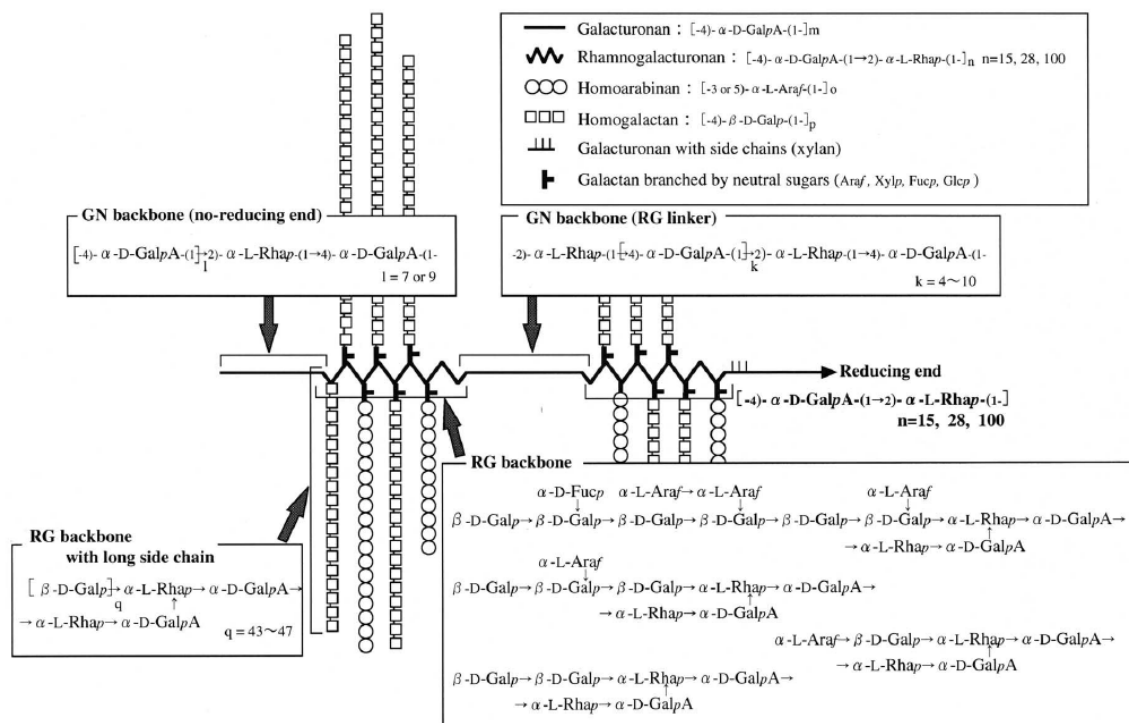


FIGURA 4 - MODELO DE ESTRUTURA QUÍMICA DO SSPS
 FONTE: NAKAMURA *et al.* (2002b)

Yamaguchi, Otab e Hatanaka (1996), isolaram de *okara* (subproduto resultante da extração do leite de soja) polissacarídeos pécnicos que compreendem regiões de galacturonana e ramnogalacturonana com cadeias laterais compostas principalmente por arabinanas e galactanas. As regiões de galacturonana são distribuídas nas extremidades redutoras e não redutoras do polímero.

Huisman *et al.* (2000), através de extração alcalina, extraíram frações polissacarídicas de farelo de soja contendo xiloglucanas. As xiloglucanas encontradas são fucosiladas e são compostas por unidades XXXG, similar a outras xiloglucanas originárias de outras plantas (Figura 5).

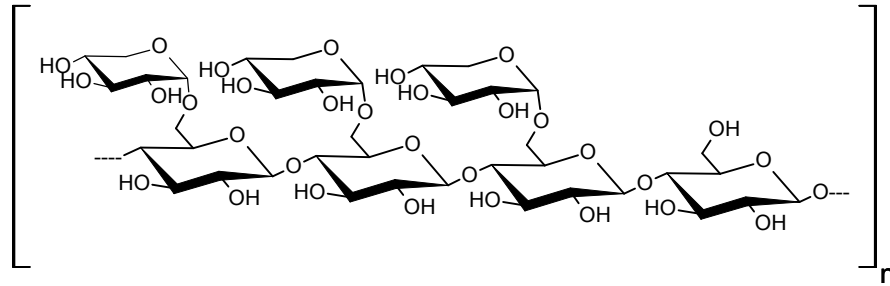


FIGURA 5 - ESTRUTURA DO POLISSACARÍDEO OBTIDO DE EXTRAÇÃO ALCALINA DE FARELO DE SOJA

FONTE: HUISMAN *et al.* (2000)

Whistler e Saarnio (1957) isolaram galactomananas da casca da soja. Análises desses polissacarídeos extraídos indicaram uma cadeia (1→4)-D-manopiranosose com unidades de D-galactopiranosil ligadas a algumas unidades de D-manose por ligações (1→6) (Figura 6). Aspinall, Hunt e Morrison (1966) após sucessivas extrações da casca de soja, encontraram em adição as galactomananas, uma xilana. Esta xilana é insolúvel em água, constituída por ligações glicosídicas do tipo β -(1→4)-ligadas caracterizada por conter baixa proporção de cadeias laterais. Xilanas com esta estrutura estão associadas com celulose em tecidos lignificados.

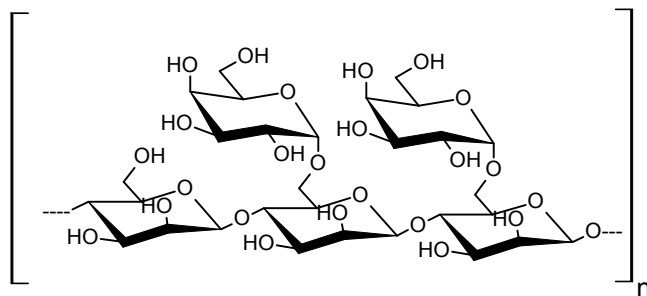


FIGURA 6 - ESTRUTURA DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DA CASCA DA SOJA

FONTE: WHISTLER; SAARNIO (1957)

Cipriani *et al.* (2009) isolaram a partir de farelo de soja uma arabinogalactana do tipo I (Figura 7). Sua cadeia principal é composta de β -D-Galp (1→4)-ligada, substituída em O-3 por unidades α -L-Araf, que por sua vez, são

macrófagos e a proliferação de esplenócitos. Liao *et al.* (2001) isolaram polissacarídeos de soja preta, com características de (1→6)- α -D-glucana, capazes de estimular macrófagos e linfócitos T, sugerindo então que estes polissacarídeos podem inibir proliferação e induzir a diferenciação de células leucêmicas U397, resultando em resposta biológica modificadora e efeito imunopotencializador. Em estudos posteriores, Liao, Chen e Yang (2005) concluíram que além das atividades já descritas, os polissacarídeos extraídos da soja preta, além de restaurar a contagem de leucócitos também reforçavam a formação de células da medula óssea.

Chen *et al.* (2010) testaram os efeitos de oligossacarídeos de soja sobre níveis de lipídios séricos, glucose e estresse oxidativo em ratos gordos. Resultados mostraram uma redução dos níveis de glucose no sangue, lipídeos séricos e estresse oxidativo nas doses de 150, 300 e 450 mg/kg indicando capacidade para reverter doenças cardio-cerebrovascular.

Cipriani *et al.* (2009) isolaram do farelo de soja uma arabinogalactana do tipo I capaz de inibir lesões gástricas induzidas por etanol em ratos, indicando um potencial efeito gastroprotetor. Os possíveis mecanismos descritos para este tipo de atividade dos polissacarídeos estão nas habilidades de ligação a superfície da mucosa agindo como uma camada protetora; diminuir atividade secretória de ácido e pepsina e proteger a mucosa pelo aumento da síntese de muco e/ou radicais de limpeza (MATSUMOTO; MORIGUCHI; YAMADA, 1993; NERGARD *et al.*, 2005; YAMADA, 1994).

Mateos-Aparicio *et al.* (2010) isolaram de *okara* (subproduto resultante da extração do leite de soja) polissacarídeos pécticos com potencial atividade antioxidante.

Tsai *et al.* (1983) testaram os efeitos da ingestão de polissacarídeos de soja nas funções gastrointestinais, balanço nutricional, excreção de esteroides, tolerância a glucose, níveis de lipídeos séricos e parâmetros do sangue em humanos. Após os 17 dias de suplementação com os polissacarídeos de soja, não houve mudanças significativas nos parâmetros de sangue e níveis de lipídeos séricos. No entanto os estudos revelaram um significativo aumento do peso do conteúdo fecal e seu teor de água, e mostraram ainda uma potencial capacidade hipoglicemiante. Takahashi *et al.* (1999) em seu trabalho demonstraram que polissacarídeos de soja solúveis em

água possuem a capacidade de reduzir o tempo de trânsito gastrointestinal devido a elevada presença de fibras em sua composição.

Neeser, Koellreutter e Wuersch (1986), Kiers *et al.* (2002), Kiers *et al.* (2003), Becker *et al.* (2007) e Becker e Galletti (2008) demonstraram em seus trabalhos a capacidade da soja em adsorver enterobactérias como *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* de modo a evitar a colonização subsequente do patógeno. A teoria mais aceita sobre o mecanismo de adsorção dessas bactérias é a de que as fímbrias do tipo I reconhecem os carboidratos, ligando-se a eles, já que estes estariam mais facilmente disponíveis do que os carboidratos existentes na superfície da mucosa intestinal (OFEK; HASTY; SHARON, 2003).

2.4.1 CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DE BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS

Existe uma grande necessidade por parte das indústrias de alimentos/rações e da medicina humana e animal em criar métodos de defesa contra doenças causadas por enterobactérias, uma vez que infecções entéricas são uma das causas globais de mortalidade, chegando a mais de dois milhões de mortes/ano (WILSON *et al.*, 2002; PATON; MORONA; PATON, 2006; RASKO; SPERANDIO, 2010; GANNER *et al.*, 2010).

As enterobactérias são bactérias gram-negativas causadoras principalmente de doenças gastrointestinais. Estão entre os principais gêneros: *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium* e *Helicobacter*.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em 2011, divulgou alguns dados sobre a problemática das doenças transmitidas por alimentos (DTA) nos Estados Unidos. A cada ano, um em cada seis americanos fica doente através da ingestão de alimentos contaminados, o que representa um total de 48 milhões de americanos doentes e 3000 mortos por ano. O CDC aponta uma redução pela metade no número de infecções causadas por *E. coli* O157 nos últimos 15 anos. Entretanto isso não acontece com as infecções causadas por *Salmonella* sp., elas continuam crescendo, sendo hoje responsáveis por 365 milhões de dólares em despesas médicas (CDC, 2011).

A Secretária de Vigilância em Saúde divulgou no ano de 2011 - uma pesquisa contendo os dados epidemiológicos da salmonelose no Brasil. Entre os anos 2000 e 2011 houveram 1660 surtos causados por *Salmonella sp*, sendo 19 surtos no ano de 2011 (SVS, 2011).

A salmonelose é transmitida principalmente através de aves, carne de porco, carne bovina (Figura 8). Juntas essas fontes são responsáveis por aproximadamente 70% da cadeia de contaminação (CDC, 2011). Esses dados refletem que, além de um problema de saúde humana, as doenças entéricas são um dos maiores problemas na pecuária (PATON; MORONA; PATON, 2006).

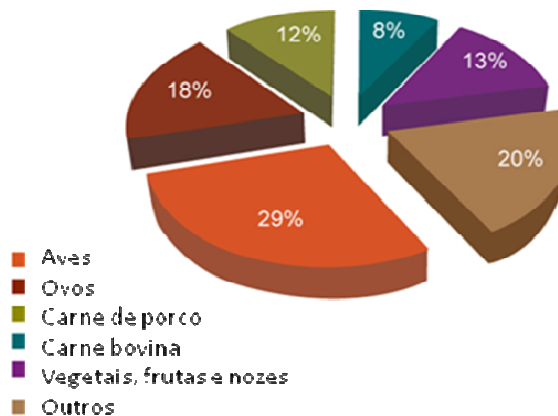


FIGURA 8 - FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE SALMONELOSE
 FONTE: ADAPTADO DE CDC (2011)

Na pecuária os antibióticos promotores de crescimento (AGP – *Growth-Promoting Antibiotics*) têm sido usados com frequência nas últimas décadas com finalidade de controlar patógenos intestinais (reduzindo mortalidade) e como promotores de performance ou saúde animal (BOROWSKY, 2009; GANNER, 2011; FERKET, 2011). Uma das reações mais importantes derivadas do uso prolongado desses antibióticos foi o surgimento de bactérias resistentes a este tipo de tratamento (SHARON; OFEK, 2000; SPRING; PRIVULESCU, 2012; HAJATI; REZAEI, 2010; GANNER, 2011). Consequentemente, pesquisas com alternativas ao uso de antibióticos têm sido intensificadas (SHARON; OFEK, 2000; BIGGS; PARSONS; FAHEY, 2007; GANNER, 2011). Alternativas naturais como óleos essenciais, leveduras, prebióticos, probióticos, oligossacarídeos, polissacarídeos, glicoconjugados são os focos de interesse e cada vez mais têm sido estudados (MORAN, 2011; GANNER, 2011).

Atualmente uma das alternativas ao uso de antibióticos com atividade comprovada, vendido comercialmente desde 1993, é o BioMos[®] da Alltech (SPEARMAN, 2004). Esse produto consiste em parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A parede celular das leveduras é composta, predominantemente por β -glucanas (35-55%) e manoproteínas (30-50%) (KLIS; BOORSMA; GROOT, 2006; KOGAN; KOCHER, 2007).

Atividades imunomoduladoras são descritas constantemente para β -glucanas (BOHN; BeMILLER, 1995; KOGAN; KOCHER, 2007; BUSSIÈRE, 2010) e as manoproteínas estão sendo correlacionadas a atividades de adsorção bacteriana (OFEK; HASTY; SHARON, 2003; MORAN, 2011). Desta forma a característica do BioMos[®] em aumentar a resistência do animal, contra doenças entéricas, e promover o crescimento é dada devido sua capacidade de: inibir a colonização de patógenos entéricos, bloqueando a adesão bacteriana (OFEK; HASTY; SHARON, 2003; SPRING; PIVUULESCU, 2012; MORAN, 2011); aumentar a imunidade (FERKET, 2011); e aumentar a barreira de muco no lúmen intestinal, através de produção de imunoglobulina A – IgA (MCKAY; PERDUE, 1993; BIGGS; PARSONS; FAHEY, 2007).

Pesquisas com outras alternativas ao uso de antibióticos estão sendo divulgadas na última década. Parede celular de *Trichosporon mycotoxinivorans* aderiram enterobactérias *in vitro* (GANNER *et al.*, 2010). *Lactobacillus johnsonii* foi capaz de competir pelos mesmos receptores que bactérias enteropatogênicas (NEESER *et al.*, 2000). *Lactobacillus acidophilus* interferiu com o processo de adesão de *Salmonella* sp. (NAKAZATO *et al.*, 2011). Polissacarídeos sulfatados de microalgas inibiram o processo de citoadesão por *Helicobacter pylori* (GUZMAN-MURILLO; ASCENCIO, 2000). Leite e seus componentes (MARTÍN-SOSA; MARTÍN; HUESO, 2002; MARTÍN; MARTÍN-SOSA; HUESO, 2002), oxicoco (*cranberry*) (BURGUER *et al.*, 2000), cenoura, café, manga (BECKER *et al.*, 2007; BECKER; GALLETTI, 2008) foram capazes de adsorver enterobactérias *in vitro*.

Propriedades anti-adesão da soja vêm sendo estudadas. Neeser, Koellreutter e Wuersch (1986) testaram oligo-, polissacarídeos e glicopeptídeos, de soja, contendo manose, quanto ao potencial inibitório de aderência bacteriana mediada por fímbrias tipo 1 de *E. coli*. Resultados demonstraram que pequenos glicopeptídeos contendo altos conteúdos de manose foram capazes de inibir hemaglutinação em eritrócitos de porcos e a adesão bacteriana em células bucais

humanas. Kiers *et al.* (2002) investigaram os efeitos inibitórios do *tempeh* sobre *Escherichia coli* (ETEC) K88. *Tempeh* é um alimento fermentado feito a partir de grãos de soja cozidos inoculados com fungo, normalmente do gênero *Rhizopus*. Extratos de *tempeh* e extratos de grãos de soja cozido inibiram *in vitro* hemaglutinação em eritrócitos de hamster induzidas pela bactéria *Escherichia coli* (ETEC) K88. Esta atividade é dada como resposta à presença de componentes que agregam e/ou adesinas análogas e/ou receptores análogos. Becker *et al.* (2007) e Becker e Galletti (2008) investigaram o *tempeh* e sua capacidade de ligação *in vitro* à diferentes espécies de bactérias (*Salmonella* sp., *E. coli*, *Lactobacillus* spp.). Bons resultados de capacidade de ligação do *tempeh* foram identificados para as espécies *E. coli* K88, *E. coli* ATCC 25922 e *S. enterica* CIDC 510.

2.4.1.1 Mecanismo de adsorção de enterobactérias

2.4.1.1.1 Processo de adesão

Adesão de patógenos à superfície do epitélio do intestino (colonização) é a primeira etapa crítica do processo de infecção (OFEK; MIRELMAN; SHARON, 1977; LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998; WILSON *et al.*, 2002; OFEK; HASTY; SHARON, 2003; MORAN, 2011). Ela é mediada por fatores de aderência microbiana chamados de adesinas. Essas adesinas podem ser proteínas ou carboidratos.

Existem três tipos principais de interações adesinas-receptor: lectinas-carboidratos; proteínas-proteínas e hidrofobinas-proteínas (OFEK; HASTY; DOYLE, 2003). O primeiro tipo de interação é a ligação de lectinas com carboidratos. As lectinas são proteínas de ligação específica a carboidratos, presentes na superfície das bactérias patogênicas, mais especificamente nas fímbrias ou na superfície da célula hospedeira (LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998). O segundo tipo de interação envolve o reconhecimento entre proteínas bacterianas e proteínas complementares localizadas na superfície da mucosa. O terceiro tipo é caracterizado pela interação entre proteínas e lipídeos (OFEK; HASTY; DOYLE, 2003).

As interações lectinas-carboidratos estão difundidas na maioria dos patógenos, por isso tem sido extensivamente estudadas (OFEK; HASTY; DOYLE, 2003). Elas são importantes para comunicação célula-célula em diversos processos fisiológicos e possuem papel crucial no evento patogênico (LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998; OFEK; DOYLE, 2003). As lectinas, em bactérias gram negativas, estão localizadas nas fímbrias, sendo capazes de reconhecer e se ligar a carboidratos complementares disponíveis sobre a superfície do tecido gastrointestinal do hospedeiro, iniciando desta forma o processo de adesão bacteriana (LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998; MORAN, 2011).

2.4.1.1.1.1 Fímbrias

As fímbrias são filamentos proteícos que se projetam da superfície da bactéria e possuem capacidade de adesão devido à presença de lectinas. As fímbrias são classificadas de acordo com as lectinas presentes e consequente especificidade aos carboidratos (LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998) e característica hemaglutinante: manose-sensíveis (MS) que têm a sua aglutinação com eritrócitos inibida pela manose; e fímbrias manose-resistentes (MR) que não apresentam hemaglutinação inibida pela manose (EVANS JR; EVANS; DUPONT, 1979; QUADRI *et al.*, 1994).

As enterobactérias possuem de modo geral fímbrias do tipo I, fazem parte do grupo MS, onde há lectinas manose específicas. Essas lectinas reconhecem glicoproteínas, ricas em manose, localizadas sobre a superfície intestinal (LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998; SPRING *et al.*, 2000; SPEARMAN, 2004; OFEK; HASTY; SHARON, 2003).

A patogênese de infecções por *Salmonella enterica* requer adesão a várias superfícies celulares do hospedeiro, e um largo número de estruturas adesivas podem ser encontradas. Dependendo do serotipo (sorovar), genes para vários tipos de adesinas fimbriais são identificadas (WAGNER; HENSEL, 2011).

Para a *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* são descritos os óperons *Lpf* (*long polar fimbriae*) que codificam fímbrias que se ligam as células M nas placas de peyer, o *Pef* (*plasmid encoded fimbriae*) que está envolvido na ligação ao

epitélio intestinal, o *Fim* que codifica a fímbria tipo I e, recentemente, foi descrito o gene *Tafi/Agf* (*thin aggregative fimbriae*) que está envolvido na síntese de um fino agregado de fímbrias denominado “*curl*” (ASTEN; DJIK, 2005; BOROWSKI, 2008; FRONZES; REMAUT; WAKSMAN, 2008; WAGNER; HENSEL, 2011). Outros genes que codificam adesinas fimbriais também já foram descritos para *Salmonella typhimurium*, são eles: *Bcf*, *Saf*, *Stb*, *Stc*, *Stf*, *Sth*, *Sti* e *Stj*. Embora as funções de muitas adesinas não sejam completamente compreendidas, estudos recentes têm sido publicados a fim de mostrar as propriedades específicas estruturais e funcionais de adesinas de *Salmonella* a fim de compreender suas ações em conjunto com outros determinantes de virulência (WAGNER; HENSEL, 2011).

Como pode-se observar, diferentes tipos de fímbrias já foram descritas para *S. typhimurium*, porém, somente as fímbrias de tipo 1, comprovadamente contribuem para a fixação em enterócitos e para a colonização no intestino (BOROWSKI, 2008, FRONZES; REMAUT; WAKSMAN, 2008; MORAN 2011). A fímbria tipo 1 é composta primariamente por subunidades proteicas denominadas FimA (98%), codificada pelo gene *fimA* (SOKURENKO *et al.*, 1994; JONES *et al.*, 1995). Entretanto, é outra subunidade, denominada FimH, que representa a lectina fimbrial, indispensável pela ligação ao epitélio. FimH é altamente específica para resíduos de manose e estão localizadas nas laterais e extremidades das fímbrias (SOKURENKO *et al.*, 1994; LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998; WEISSMAN *et al.*, 2003; GRZYMAJTO *et al.*, 2010; WAGNER; HENSEL, 2011).

2.4.1.1.2 Mecanismo anti-adesão

A capacidade de bloquear a adesão bacteriana representa uma estratégia ideal para combater a patogênese bacteriana devido à sua importância no início do processo infeccioso. É também adequada para aplicação como uma estratégia profilática para evitar a infecção, uma vez que impedindo a colonização de patógenos no intestino humano e animal se reduz o número de infecções gastrointestinais e o risco de transmissão pela cadeia alimentar (BECKER, 2005; BECKER *et al.*, 2007; GANNER, 2011; GANNER *et al.*, 2010).

A principal desvantagem da terapia anti-adesão está em que a maioria dos patógenos possui genes que codificam mais de um tipo de adesina, de modo que durante o processo infeccioso, mais de uma destas adesinas possam ser expressas pela população de patógenos. A adesão pode também envolver outros fatores além de adesinas-receptores, tais como interações hidrofóbicas ou outras interações não-específicas. Para a terapia anti-adesão ser completamente efetiva, é necessário o uso de múltiplos agentes que inibem especificamente cada tipo de adesina do patógeno infectante ou um simples agente com amplo espectro de atividade anti-adesão (BECKER; GALLETTI, 2008).

Na tentativa de reduzir o número de doenças entéricas e baseado nesses conceitos de terapia anti-adesão, muitos produtores estão incluindo materiais ricos em manose nas dietas animais (MOLIST *et al.*, 2011). O mecanismo anti-adesão não está totalmente elucidado (SPRING; PRIVULESCU, 2012; HAJATI; REZAEI, 2010), no entanto algumas teorias são descritas (Figura 9). A mais difundida é evidenciada com o uso de receptores análogos, onde a enterobactéria (p.e. *Salmonella* sp.), através das lectinas localizadas nas fímbrias, se ligará a manose livre (fenômeno de adsorção) devido a sua alta disponibilidade e concentração, evitando conseqüentemente o processo de adesão e infecção (Figura 9B) (OFEK; MIRELMAN; SHARON, 1977; MORAN, 2011). A bactéria ligada ao material rico em manose será então “lavada” pelo intestino. Este mecanismo é conhecido como “*Oligosaccharide Decoy Mechanism*”, ou seja, mecanismo de armadilha dos oligossacarídeos (FIRON *et al.*, 1987; MORAN, 2011).

Outra teoria a respeito das terapias anti-adesão é baseada no uso de adesinas análogas (Figura 9C). Essas moléculas de adesinas isoladas se ligam aos receptores e competitivamente bloqueiam a adesão bacteriana (OFEK; HASTY; DOYLE, 2003). No entanto o uso análogos de adesina para terapia anti-adesão pode ser impraticável, pois elas são tipicamente macromoléculas que não estão prontamente disponíveis além de ser necessário empregá-las em altas concentrações. Além disso, uma cuidadosa consideração deve ser dada a sua toxicidade e imunogenicidade (BEACHEY, 1981; OFEK; HASTY; SHARON, 2003).

Cabe destacar que informações sobre polissacarídeos e suas fontes de obtenção, acessibilidade, concentração e possíveis estruturas dos receptores para adesão bacteriana ainda não estão explícitas. Mais estudos são necessários para elucidar tais informações (BECKER; GALLETTI, 2008).

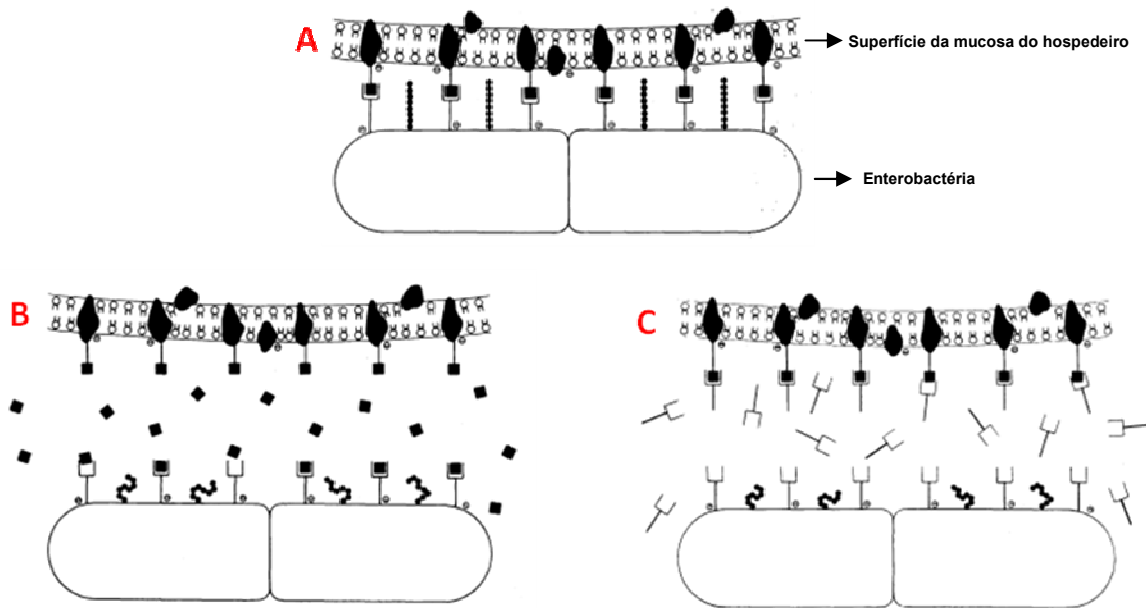


FIGURA 9 - MECANISMOS ANTI-ADESÃO. U: ADESINA (LECTINAS). ■: CARBOIDRATOS. A) MECANISMO NORMAL DE ADESÃO: AS ADESINAS DA BACTÉRIA RECONHECEM CARBOIDRATOS NA SUPERFÍCIE DA MUCOSA O QUE RESULTA EM ADESÃO. B) USO DE RECEPTORES ANÁLOGOS (P.E. MANOOLIGOSSACARÍDEOS - MOS): OS RECEPTORES ANÁLOGOS SE LIGAM NAS LECTINAS DA BACTÉRIA IMPEDINDO A ADESÃO. C) USO DE ADESINAS ANÁLOGAS: AS ADESINAS ANÁLOGAS RECONHECEM OS CARBOIDRATOS NA SUPERFÍCIE DA MUCOSA E SE LIGAM IMPEDINDO A ADESÃO
 FONTE: ADAPTADO DE BEACHEY (1981)

2.4.1.2 Ensaios *in vitro* de adsorção de enterobactérias

Uma considerável quantidade de pesquisas têm sido realizadas a fim de esclarecer como as bactérias se aderem a superfície celular. Similarmente diferentes agentes capazes de bloquear a adesão de bactérias nas superfícies têm sido desenvolvidos. Embora a adesão seja a base da patogênese, um pequeno número de técnicas podem ser usadas para medi-la (VESTERLUND *et al.*, 2005).

A detecção é realizada principalmente por avaliação visual ou automática da aglutinação ou ligação bacteriana (VESTERLUND *et al.*, 2005). Neste último caso, a percepção de bactérias é facilitada pela marcação de fluorescência ou coloração (VESTERLUND *et al.*, 2005), por biotina-rotulagem, por marcação radioativa (VESTERLUND *et al.*, 2005; NEESER *et al.*, 2000), pela medição da atividade metabólica (urease em caso de *Helicobacter*) (BURGER *et al.*, 2000), por meio de anticorpos (SOKURENKO; McMACKIN; HASTY, 1995), por determinação de unidades formadoras de colônias (NAUGHTON; MIKKELSEN; JENSEN, 2001), ou

por determinação de um ponto de crescimento bacteriano através de sua densidade óptica e sua correlação com a contagem de colônias (UFC/mL) (SOKURENKO; McMACKIN; HASTY, 1995; BECKER *et al.*, 2007; GANNER *et al.*, 2010). Esta última será a metodologia utilizada no presente trabalho para avaliar a atividade anti-adesão das frações isoladas de farelo de soja.

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil é mundialmente o segundo maior produtor de soja. Embora seja um grão com aplicação bastante versátil, seu uso mais conhecido é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Esse processo de extração do óleo bruto da soja gera altas quantidades de um subproduto conhecido como farelo de soja.

O farelo representa em torno de 70% da semente de soja, portanto, a cada tonelada de grão de soja que é destinada para extração de óleo, 700 kg de farelo de soja são gerados. A previsão para o ano de 2011 é de que sejam produzidos no Brasil 52,5 milhões de toneladas de farelo de soja, sendo 10,7 milhões no estado do Paraná. A maior parte desse farelo de soja é destinada a produção de ração animal ou é descartada pelas indústrias. Sua composição nutricional inclui alto teor de proteínas e carboidratos, indicando ser uma fonte com potencial de utilização para fins biotecnológicos.

Existem poucos estudos sobre a atividade biológica de polissacarídeos obtidos do farelo de soja. A pesquisa por novas moléculas como alternativas ao uso de antibióticos torna-se de alta relevância, tanto para a área da saúde quanto à indústria e para o próprio setor agrícola, uma vez que permite o conhecimento de novas fontes com potencial biológico provenientes de um resíduo de baixo custo e alta disponibilidade no Brasil. Sendo assim, busca-se então estudar os polissacarídeos nativos e quimiotransformados do farelo de soja, quanto a sua estrutura fina e capacidade de adsorção à bactérias enteropatogênicas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a capacidade de ligação *in vitro* à bactérias enteropatogênicas (*Salmonella sp.*) dos extratos nativos e quimiotransformados isolados do farelo de soja.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos aquosos utilizando condições brandas (Extratos nativos) e fortes (Extratos quimiotransformados) do farelo de soja;
- Determinar, por métodos químicos e espectroscópicos, a composição e estrutura química dos extratos nativos e quimiotransformados;
- Determinar a capacidade de ligação *in vitro* dos extratos nativos e quimiotranformados;
- Comparar a capacidade de ligação *in vitro* entre os extratos nativos e quimiotranformados;
- Comparar a capacidade de ligação *in vitro* entre os extratos nativos/quimiotranformados ao BioMos[®].

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

Amostras de farelo de soja, provenientes da IMCOPA (Importação e Comércio Paraná), foram cedidas pela empresa BIO4 – Soluções Biotecnológicas. Este farelo de soja é o produto resultante do esmagamento dos grãos de soja destinados à extração de óleo de soja contendo 5% de lipídeos residuais.

5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Foram adotadas cinco estratégias diferentes para extração de polissacarídeos do farelo de soja, denominadas estratégias 1 até 5; sendo a estratégia 1 destinada a obtenção de extratos nativos, as estratégias 2 e 4 destinadas a obtenção de extratos quimiotransformados (polissacarídeos quimiotransformados) e as 3 e 5 sendo os respectivos controles das estratégias 2 e 4.

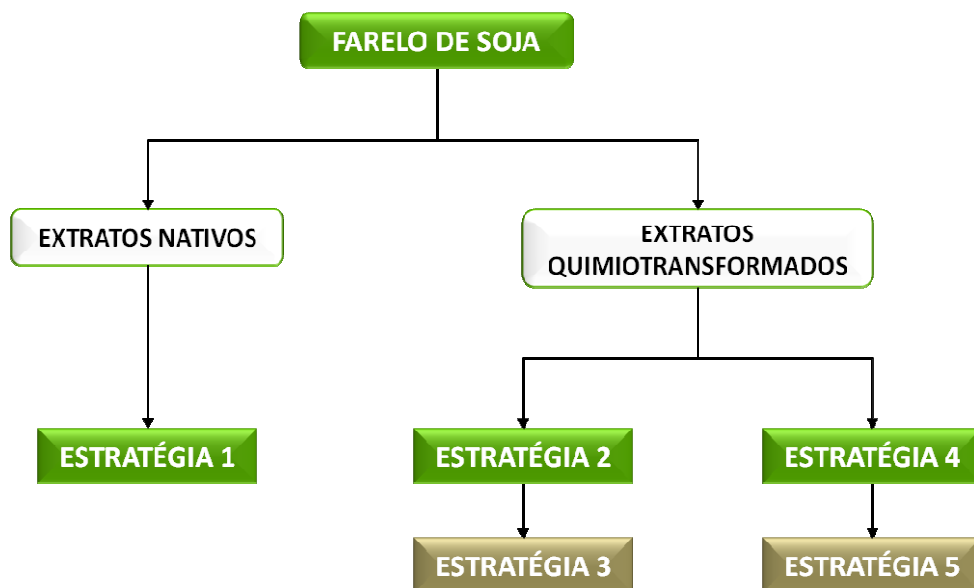


FIGURA 10 - ESTRATÉGIAS DE EXTRAÇÃO

5.2.1 Estratégia 1

O farelo de soja foi submetido a extrações aquosas sequenciais numa concentração de 11,4 g%, em temperatura ambiente, sob agitação mecânica constante durante 4 h. Este processo de extração a frio foi realizado duas vezes, e o resíduo obtido foi submetido a duas extrações aquosas a quente (80 °C), por 4 h, sob agitação mecânica. Entre uma extração e outra a amostra foi filtrada em um tecido fino para remoção da maior parte do resíduo e o extrato obtido centrifugado (8000 rpm, 10 °C, 15 min). Os resíduos obtidos na filtração e centrifugação foram agrupados e submetidos à próxima extração. Em ambos os processos de extração, a frio e a quente, os sobrenadantes obtidos, após a centrifugação, tiveram seu volume reduzido, até uma terça parte, em rota-evaporador e foram tratados com três volumes de etanol 95%, permanecendo em repouso *overnight*, sob uma temperatura entre 2-8 °C. Os precipitados foram separados por centrifugação (8000 rpm, 5 °C, 15 min), ressolubilizados em água destilada (qsp solubilização do material), concentrados e liofilizados, originando as frações obtidas da extração aquosa a frio (FS-1 e FS-2) e a quente (FS-3 e FS-4). Os sobrenadantes etanólicos foram concentrados, ressolubilizados em água destilada e liofilizados, originando as frações obtidas do sobrenadante etanólico (FS-E1, FS-E2, FS-E3 e FS-E4). O esquema geral de obtenção dos extratos aquosos do farelo de soja está apresentado na Figura 11.

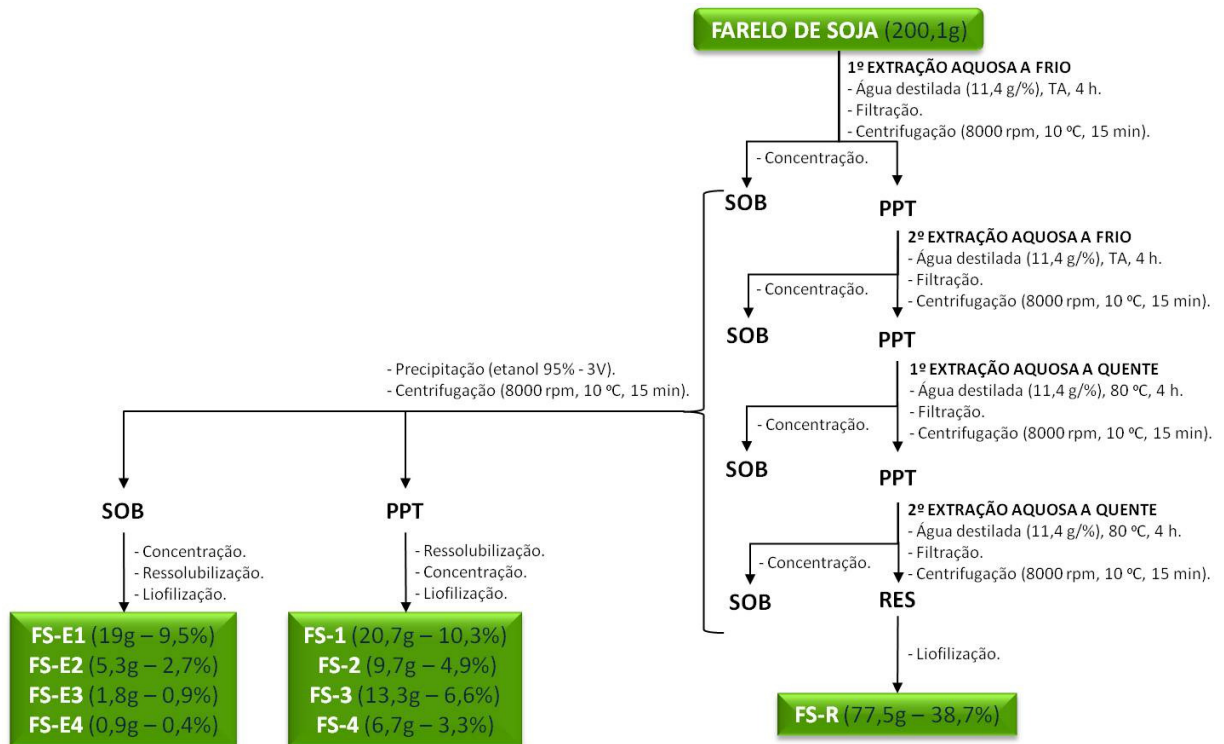


FIGURA 11 - ESTRATÉGIA 1 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS NATIVOS DO FARELO DE SOJA

RES: Resíduo; SOB: Sobrenadante; PPT: Precipitado

5.2.2 Estratégia 2

O farelo de soja após ser diluído em água destilada (15 g%) teve seu pH ajustado para 2,0 com HCl 1 M, e foi submetido a uma pressão relativa de 1 atm, 121 °C por 1 h (processo de autoclavação). Após este tratamento o material foi filtrado com auxílio de um coador de pano; o retido foi liofilizado e o filtrado foi neutralizado com NaOH 0,5 M e centrifugado (8000 rpm, 10 °C, 15 min). O precipitado obtido foi ressuspenso em água destilada, dialisado contra água destilada, em membranas de 12-14 kDa, e liofilizado, dando origem a fração EAF-AP. O sobrenadante foi novamente submetido ao processo de autoclavação por mais 15 min, em seguida foi dialisado contra água destilada, em membranas de 12-14 kDa, liofilizado e denominado de EAF-A. A retirada do sal em excesso nas diálises foi monitorada com o teste do AgNO₃ (ASSUMPÇÃO, MORITA, 1968), que indica a presença dos íons Cl⁻. O esquema geral de obtenção dos polissacarídeos quimiotransformados do farelo de soja (Estratégia 2) está apresentado na Figura 12.

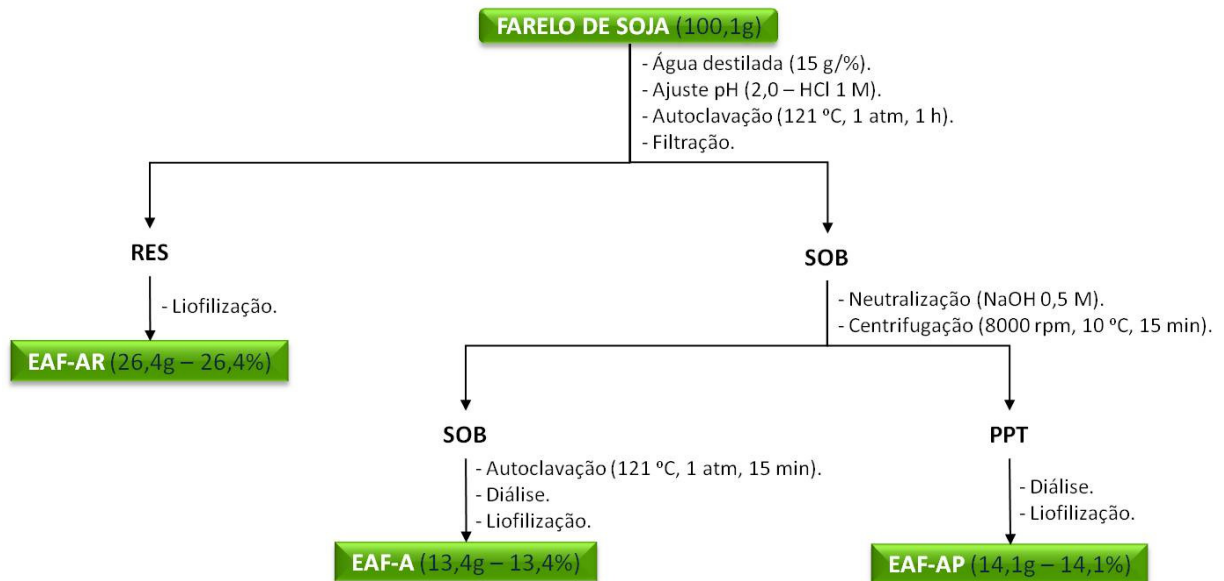


FIGURA 12 - ESTRATÉGIA 2 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DO FARELO DE SOJA
RES: Resíduo; SOB: Sobrenadante; PPT: Precipitado

5.2.3 Estratégia 3

Esta estratégia permite avaliar o efeito do pH ácido na estratégia 2 (controle da estratégia 2). O farelo de soja após suspensão em água destilada (15 g%) teve seu pH ajustado para 7,0 com NaOH 0,5 M, e foi submetido a uma pressão relativa de 1 atm, 121 °C por 1 h (processo de autoclavação). Após este tratamento o material foi filtrado com auxílio de um coador de pano; o retido foi liofilizado e o filtrado foi neutralizado com NaOH 0,5 M e centrifugado (8000 rpm, 10 °C, 15 min). O precipitado obtido foi ressuspenso em água destilada, dialisado contra água destilada, em membranas de 12-14 kDa, e liofilizado, dando origem a fração EAF-NP. O sobrenadante foi novamente submetido ao processo de autoclavação por mais 15 min, em seguida foi dialisado contra água destilada, em membranas de 12-14 kDa, liofilizado e denominado de EAF-N. O esquema geral de obtenção dos polissacarídeos quimiotransformados do farelo de soja (Estratégia 3) está apresentado na Figura 13.

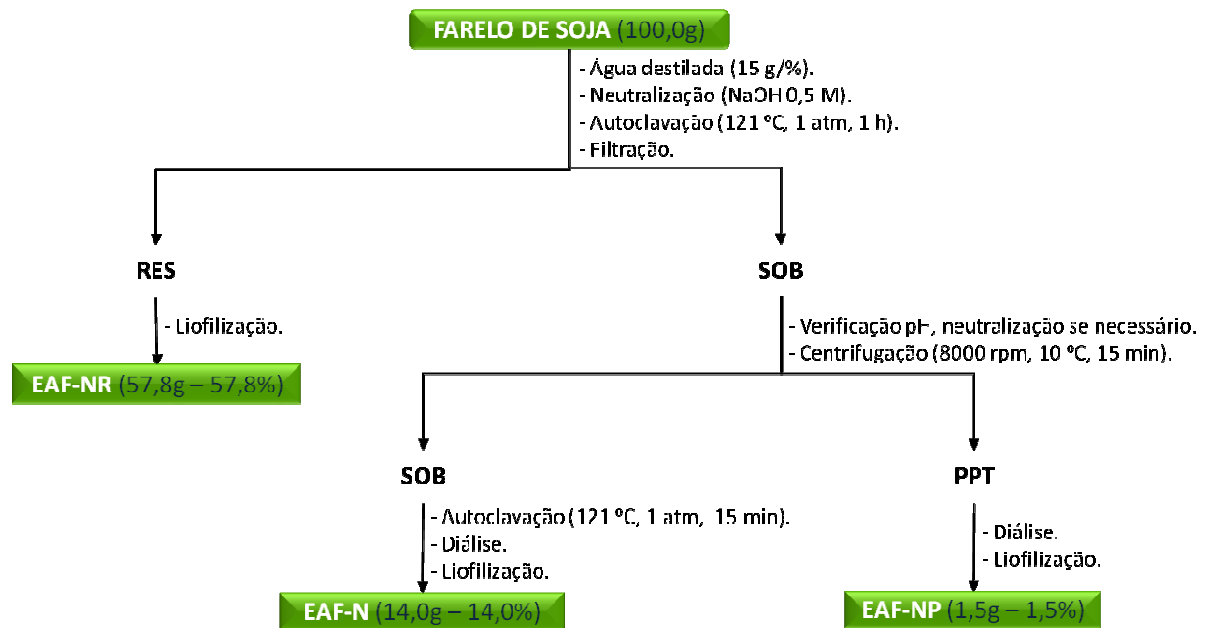


FIGURA 13 - ESTRATÉGIA 3 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DO FARELO DE SOJA
RES: Resíduo; SOB: Sobrenadante; PPT: Precipitado

5.2.4 Estratégia 4

O farelo de soja após suspensão em água destilada (15 g%) teve seu pH ajustado para 2,0 com HCl 1 M, e foi submetido a uma pressão relativa de 1 atm, 121 °C por 1 h (processo de autoclavação). Após este tratamento, o material foi filtrado com auxílio de um coador de pano; o filtrado foi neutralizado com NaOH 0,5 M e centrifugado (8000 rpm, 10 °C, 15 min). O precipitado obtido foi reunido ao material retido anteriormente na filtração e submetidos a mais um ciclo de extração. Os sobrenadantes foram novamente submetidos ao processo de autoclavação por mais 15 min, e em seguida concentrados até 30% do seu volume original. Uma solução de TCA (80% p/v) foi então adicionada numa proporção de 1:6 (uma parte de TCA para seis partes da solução de amostra) para precipitação de proteínas. As misturas foram homogeneizadas durante 10 min e centrifugadas (10000 rpm, 5 °C, 10 min). Os precipitados foram ressolubilizados em água destilada, neutralizados, dialisados contra água destilada, em membranas de 6-8 kDa, e liofilizados, originando os extratos precipitados com TCA (EAF-A1Tp e EAF-A2Tp). Aos sobrenadantes foram adicionadas três partes de etanol (96 °GL; 4 °C, 18 h). Após

centrifugação (10000 rpm, 5 °C, 10 min) os precipitados obtidos foram ressuspensos em água, neutralizados, dialisados contra água destilada, em membranas de 6-8 kDa, e liofilizados, dando origem as frações obtidas a partir dos precipitados etanólicos (EAF-A1Ep e EAF-A2Ep). Os sobrenadantes após terem seus volumes reduzidos, foram também ressuspensos em água, neutralizados, dialisados contra água destilada em membranas de 6-8 kDa, e liofilizados, dando origem as frações obtidas a partir do sobrenadante etanólico (EAF-A1Es e EAF-A2Es). A retirada do sal em excesso nas diálises foram monitoradas com o teste do AgNO_3 (ASSUMPÇÃO, MORITA, 1968). O esquema geral de obtenção dos polissacarídeos quimiotransformados do farelo de soja (Estratégia 4) está apresentado na Figura 14.

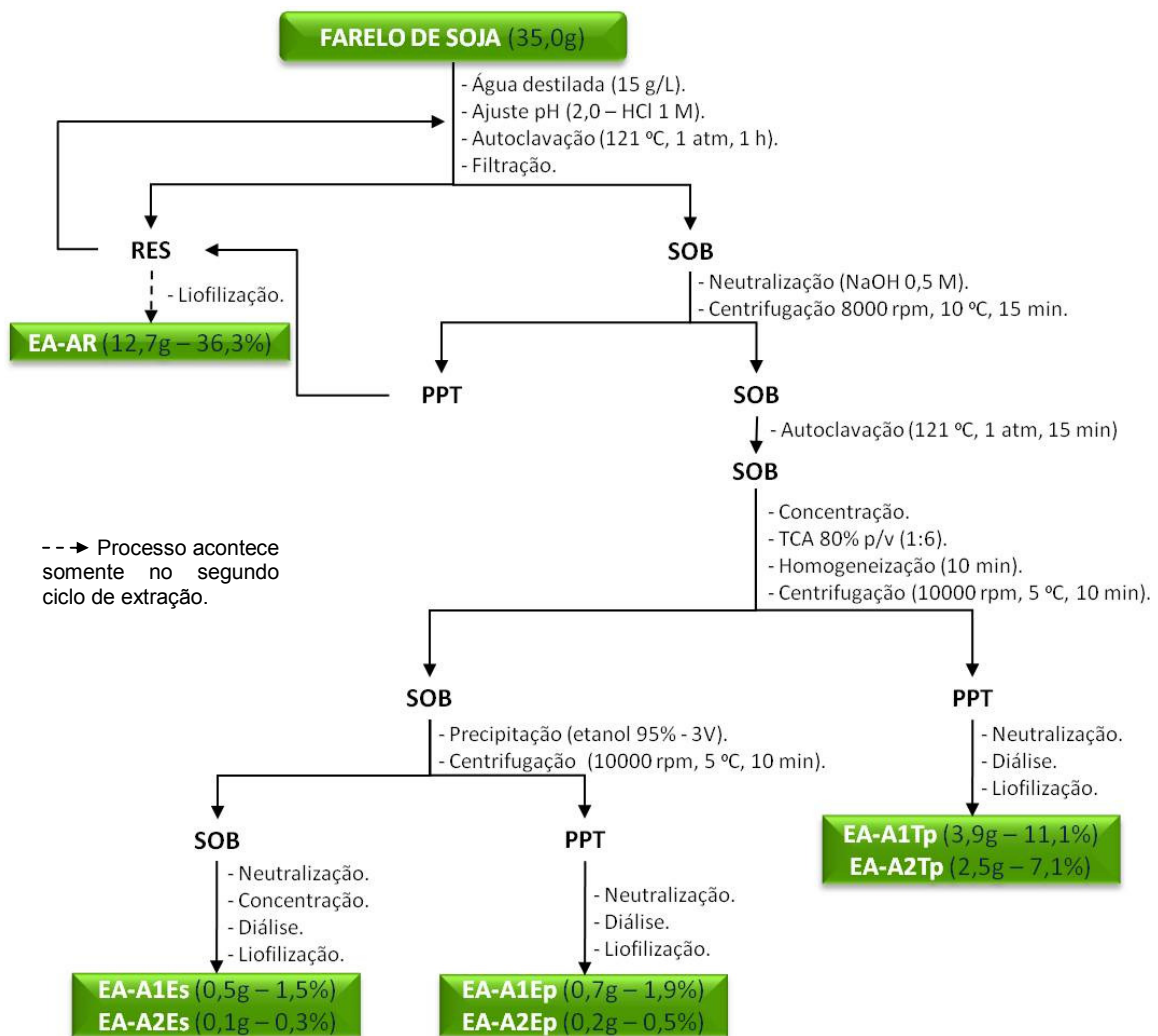


FIGURA 14 - ESTRATÉGIA 4 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DO FARELO DE SOJA
RES: Resíduo; SOB: Sobrenadante; PPT: Precipitado

5.2.5 Estratégia 5

Controle da Estratégia 4. O farelo de soja após suspensão em água destilada (15 g%) teve seu pH ajustado para 7,0 com NaOH 0,5 M, e foi submetido a uma pressão relativa de 1 atm, 121°C por 1 h (processo de autoclavação). Após este tratamento, o material foi filtrado com auxílio de um coador de pano e centrifugado (8000 rpm, 10 °C, 15 min). O precipitado obtido foi reunido ao material retido anteriormente na filtração e submetidos a mais um ciclo de extração. Os sobrenadantes foram novamente submetidos ao processo de autoclavação por mais 15 min, e em seguida concentrados até 30% do seu volume original. Uma solução de TCA (80% p/v) foi então adicionada numa proporção de 1:6 (uma parte de TCA para seis partes da solução de amostra) para precipitação de proteínas. As misturas foram homogeneizadas durante 10 min e centrifugadas (10000 rpm, 5 °C, 10 min). Os precipitados foram ressolubilizados em água destilada, neutralizados, dialisados contra água destilada, em membranas de 6-8 kDa, e liofilizados, originando os extratos precipitados com TCA (EAF-N1Tp e EAF-N2Tp). Aos sobrenadantes foram adicionadas três partes de etanol (96 °GL; 4 °C, 18 h). Após centrifugação (10000 rpm, 5 °C, 10 min) os precipitados obtidos foram ressuspensos em água, neutralizados, dialisados contra água destilada, em membranas de 6-8 kDa, e liofilizados, dando origem as frações obtidas a partir dos precipitados etanólicos (EAF-N1Ep e EAF-N2Ep). Os sobrenadantes após terem seus volumes reduzidos, foram também ressuspensos em água, neutralizados, dialisados contra água destilada em membranas de 6-8 kDa, e liofilizados, dando origem as frações obtidas a partir do sobrenadante etanólico (EAF-N1Es e EAF-N2Es). O esquema geral de obtenção dos polissacarídeos quimiotransformados do farelo de soja (Estratégia 5) está apresentado na Figura 15.

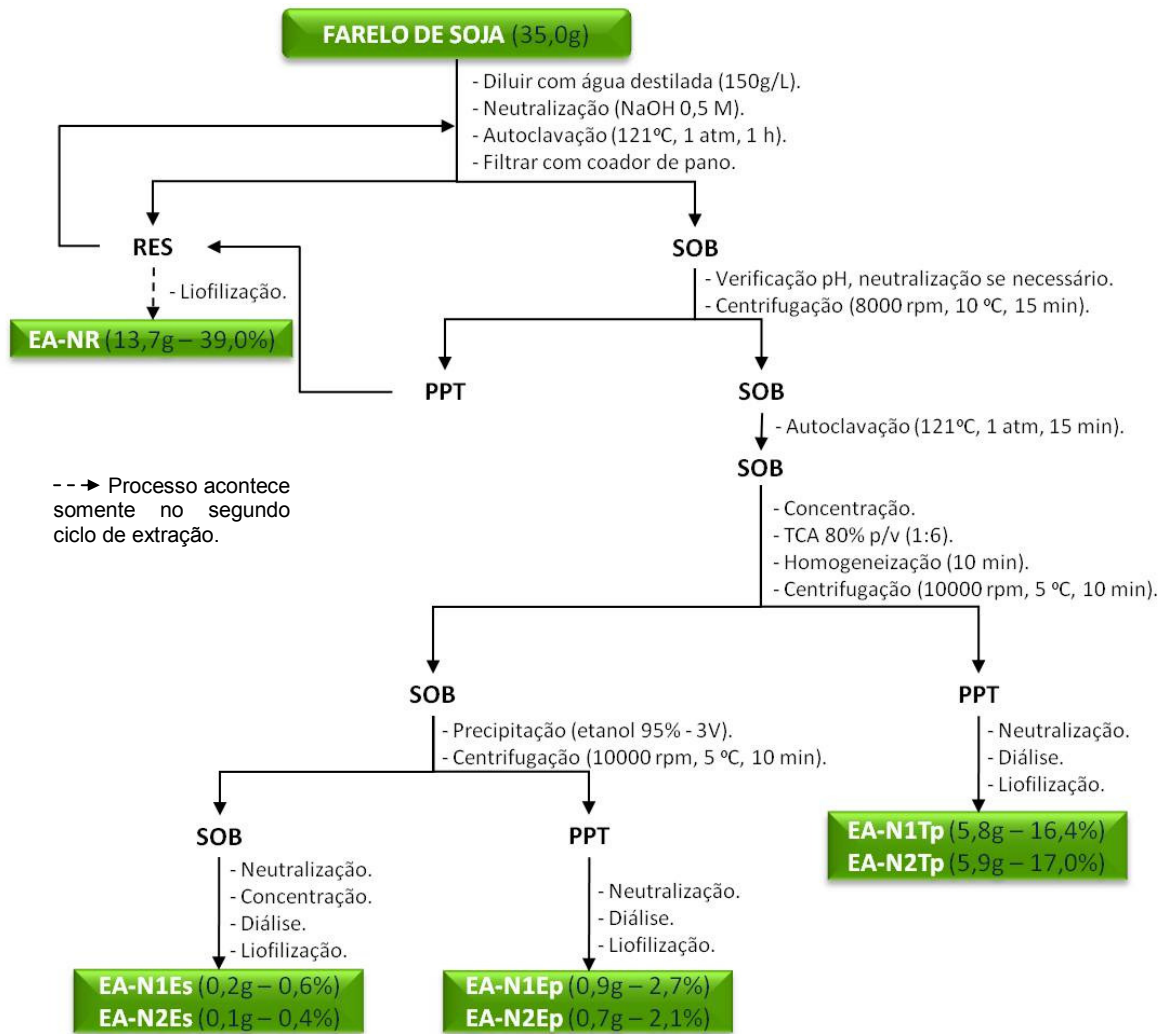


FIGURA 15 - ESTRATÉGIA 5 UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DO FARELO DE SOJA
RES: Resíduo; SOB: Sobrenadante; PPT: Precipitado

5.3 PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

5.3.1 Diálise fechada

A fração FS-1 foi submetida a uma diálise fechada, com o objetivo de eliminar moléculas de baixa massa molecular. A diálise foi realizada contra água destilada em sistema fechado, sob agitação, em recipientes de aproximadamente 500 mL até teste de fenol – ácido sulfúrico negativo (DUBOIS *et al.*, 1956) na água de diálise. Foi utilizada membrana de diálise capaz de reter moléculas com massa

molecular maior ou igual a 2 kDa. A fração retida na membrana foi denominada de FS-1d.

5.3.2 Tratamento com TCA

O tratamento com TCA se deu a partir de uma adaptação da metodologia de Lima (2008). As frações FS-1, EAF-A e EAF-N foram ressolubilizadas em água destilada (10% p/v) e adicionadas de uma solução de TCA (80% p/v) numa proporção de 1:6 (uma parte de TCA para seis partes da solução de amostra) sob agitação por 10 min. A centrifugação (10000 rpm, 5 °C, 10 min) dos extratos polissacarídicos tratados originou precipitados e sobrenadantes, os quais foram ressolubilizados em água destilada, neutralizados, dialisados contra água destilada, em membranas de 12-14 kDa, e liofilizados. Sendo assim, o tratamento com TCA originou frações obtidas a partir dos sobrenadantes (FS-1Tp, EAF-ATp e EAF-NTp) e precipitados (FS-1Tp, EAF-ATp e EAF-NTp).

5.3.3 Tratamento enzimático

As frações FS-1d, EAF-A e EAF-N, que apresentarem conteúdo significativo de proteínas foram também tratadas com enzima Pronase E (protease obtida de *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich, código: P5147), com o objetivo de hidrolisar as proteínas presentes, resultando num aumento no teor de carboidratos. Para tanto as amostras foram dissolvidas (2,5% p/v) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e enzima (1% p/p) foi adicionada. As misturas foram então incubadas a 37 °C, por 24 h. Após o período de incubação, a enzima foi inativada (80 °C, 20 min), a suspensão foi centrifugada e os sobrenadantes foram dialisados contra água destilada, em membranas de 12-14 kDa, e liofilizados, resultando nas frações FS-1te, EAF-Ate e EAF-Nte, respectivamente.

5.3.4 Tratamento com CaCl₂

Com o objetivo de precipitar o polímero contendo ácidos urônicos, a fração EAF-A1Ep foi submetida ao tratamento com CaCl₂. Para tanto a amostra foi solubilizada em água destilada e adicionada de uma solução de CaCl₂ 1 M até que a concentração final atingisse 0,25 M. Esta solução permaneceu sob agitação magnética *overnight*. A centrifugação (10000 rpm, 5 °C, 10 min) originou sobrenadante e precipitado que foram dialisados contra água destilada, em membranas de 6-8 kDa, e liofilizados, denominados respectivamente de EAF-A1Cs e EAF-A1Cp.

5.3.5 Cromatografia de Troca Aniônica

A fração EAF-A1 foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna de vidro (8 cm x 2 cm d.i.) contendo DEAE-Sephacel (Cl⁻). A amostra foi eluída com água destilada e soluções de NaCl em concentrações crescentes (0,50; 1,0; 1,5 M de NaCl). As eluições foram monitoradas pelo teste fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

As amostras recuperadas do fracionamento por troca aniônica, após diálise contra água destilada até Cl⁻ negativo (teste do AgNO₃ – ASSUMPÇÃO, MORITA, 1968) foram liofilizadas e denominadas EAF-A1-w, para a fração eluída com água e EAF-A1-0,5, EAF-A1-1,0 e EAF-A1-1,5 para as frações eluídas com soluções de NaCl 0,50; 1,0 e 1,5 M respectivamente.

5.3.6 Cromatografia de Exclusão

A fração EAF-A1 foi submetida à cromatografia de exclusão em coluna de vidro (82 cm x 3 cm d.i.) contendo 500 mL de Sepharose 6B (faixa de fracionamento

de 1×10^4 a 4×10^6 Da). A eluição foi realizada com água destilada com um fluxo de aproximadamente $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Após aplicação da amostra na coluna, o volume morto foi coletado (~30% do volume do gel) numa proveta, e usando um coletor de frações, o restante do volume total da coluna foi coletado, agrupando frações de 5 mL/tubo. A detecção de carboidratos foi feita pelo teste colorimétrico do fenol – ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e das proteínas através da leitura das absorvâncias em comprimento de onda de 280 nm.

5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E DAS FRAÇÕES

5.4.1 Métodos Colorimétricos

5.4.1.1 Dosagem de Açúcares Totais

As dosagens de açúcares totais foram realizadas pelo método do fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), que possui intervalo linear entre 10 - 85 μg de galactose. O princípio desta técnica baseia-se na ação do ácido sulfúrico sobre o açúcar, que perde duas moléculas de água para formar o derivado hidroximetilfurfural (para as hexoses) ou furfural (para as pentoses). Estes reagem com o fenol formando um composto colorido que absorve no comprimento de onda de 490 nm. A curva padrão foi montada a cada dosagem utilizando como padrão galactose (1 mg/mL) ou uma mistura 1:1 de galactose e ácido galacturônico (1 mg/mL).

5.4.1.2 Dosagem de Proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry *et al.*, (1951), que possui intervalo linear entre 5 - 100 µg de proteína. O princípio do método baseia-se na reação das proteínas com uma solução de cobre alcalino e reagente de Folin-Ciocalteu. O desenvolvimento de um composto com coloração azul intensa acontece em duas etapas: a reação entre proteínas e cobre em meio alcalino, e a subsequente redução do reagente de Folin-Ciocalteu. A coloração é medida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660 nm. A curva padrão foi montada a cada dosagem utilizando como padrão soro-albumina bovina cristalizada (1 mg/mL).

5.4.1.3 Dosagem de Ácidos Urônicos

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método do *m*-hidroxibifenil, descrito por Filizetti-Cozzi e Carpita (1991), que possui intervalo linear entre 0,97 – 38,8 µg de ácidos urônicos. Neste método os açúcares são tratados com ácido sulfúrico concentrado a fim de gerar produtos que reagem com o reagente de cor *m*-hidroxibifenil, formando um composto colorido que absorve no comprimento de onda de 525 nm. A curva padrão foi montada a cada dosagem utilizando como padrão ácido galacturônico (0,1 mg/mL).

5.4.2 Determinação da Composição Monossacarídica

A composição monossacarídica dos polissacarídeos foi determinada através da hidrólise ácida total seguida de derivatização até acetatos de alditois. Aproximadamente 2 mg das frações obtidas nas extrações foram hidrolisadas com 1,0 ml de TFA 2 N, durante 6 h a 100°C (LIAO *et al.*, 2001). Após hidrólise o ácido foi removido por evaporação até *secura total*. Os produtos de hidrólise foram

ressuspendidos em H₂O e reduzidos com NaBH₄ *overnight*. Após a etapa de redução, o excesso de borohidreto foi transformado em ácido bórico pelo abaixamento do pH através da adição de ácido acético até pH 5,0. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol, na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados (anidrido acético, 120 °C, 1 h), extraídos em clorofórmio, e lavados com bicarbonato de sódio e água para retirada dos ácidos e sais formados. Após evaporação do clorofórmio os monossacarídeos na forma de acetatos de alditóis foram analisados por CLG.

5.4.3 Métodos Cromatográficos

5.4.3.1 Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG)

As análises por cromatografia líquido-gasosa foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN, com detector de ionização de chama, sendo utilizado nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,0 mL/min) e coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.), revestida internamente com DB-225 (0,25 µm). As análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas a 220 °C, com o injetor a 250 °C e detector de ionização de chama a 300 °C.

5.4.3.2 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão acoplada a detector de Índice de Refração Diferencial e Espalhamento de Luz em Multiângulos (HPSEC-MALLS/RID)

Para as análises de homogeneidade e de determinação da massa molecular ponderal média (M_w) as amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio (NaNO₂ 0,1 M) e azida sódica (NaN₃ 200 ppm) numa concentração de 1 mg/mL, sendo filtradas em membrana Millipore (éster de celulose ou acetato de celulose) com porosidade de 0,22 µm.

Os ensaios de homogeneidade e a determinação da massa molar das amostras foram realizados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (RID) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série, dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Utilizaram-se quatro colunas de gel permeação WATERS Ultrahydrogel^{lm} dispostas de forma sequencial e apresentando diferentes limites de exclusão: 7×10^6 (coluna 2000); 4×10^5 (coluna 500); 8×10^4 (coluna 250) e 5×10^3 (coluna 120). O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) contendo azida sódica (NaN_3 200 ppm), com fluxo de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc) foi determinada para amostras homogêneas, utilizando soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg das amostras em 1 mL de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida sódica (NaN_3 200 ppm). As massas molares foram determinadas a partir do perfil de eluição e valores de dn/dc . Os cálculos foram efetuados pelo software ASTRA.

5.4.4 Método Espectroscópico

5.4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em sonda (*widebore probe*) para tubos de 5 mm de diâmetro externo, utilizando água deuterada (D_2O) 99% e temperaturas entre 50 a 70 °C. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm, utilizando acetona como padrão interno (30,2 e 2,224 ppm para ^{13}C e ^1H , respectivamente).

Os espectros desacoplados de RMN de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 s, sendo feitas entre

4000 e 70000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 s entre os pulsos. As amostras foram dissolvidas em D₂O, em uma concentração de ~40 mg/mL.

5.5 ESTUDOS BIOLÓGICOS *In Vitro*

5.5.1 Ensaio de capacidade de ligação

Os ensaios de capacidade de ligação foram realizados segundo as metodologias propostas por Becker *et al.* (2007) e Ganner *et al.* (2010). Estas metodologias determinam *in vitro* a capacidade de ligação à bactérias enteropatogênicas através da relação densidade óptica (OD) x unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

5.5.1.1 Bactérias

Os testes foram realizados com a enterobactéria *Salmonella typhimurium*, cedida pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (Departamento de Fiscalização e de Defesa Agropecuária da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná).

5.5.1.2 Curva padrão

A primeira etapa do protocolo consiste em confeccionar um gráfico log UFC (Unidades Formadoras de Colônias) x tempo de detecção. O tempo de detecção corresponde ao tempo necessário para alcançar a densidade óptica de 0,1 quando do crescimento bacteriano.

Para tal, as bactérias foram cultivadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) durante 24 h, a 37 °C. A suspensão bacteriana teve sua densidade óptica ajustada para 0,1. A partir dessa suspensão, foram realizadas diluições sucessivas em PBS (tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0). De cada diluição, 0,1 mL foi utilizado para plaqueamento e 0,1 mL para a leitura da densidade óptica. O plaqueamento foi realizado com as diluições 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , em triplicata, em BHI-Ágar por profundidade, seguido de incubação a 37 °C e posterior contagem das UFC.

Para as leituras das densidades ópticas, foram utilizadas placas de poliestireno de alta aderência (Corning – Costar 3590), previamente bloqueadas com BSA, preenchidas com 200 µL de meio TSB (*Tryptic Soy Broth*), incubadas a 37 °C, por 8 h em leitor de microplacas TECAN Infinite M200, fornecendo leituras das densidades ópticas em 690 nm a cada 15 min. O bloqueio dos poços se deu através da incubação de 300 µL de uma solução de BSA 1% por 1 h a 4 °C, seguida da lavagem com 300 µL de PBS por 3 vezes. Cada diluição foi plaquada em quintuplicata.

Ao final uma curva foi plotada, onde log UFC se encontra no eixo das ordenadas e tempo de detecção no eixo das abcissas.

5.5.1.3 Amostras

Soluções das amostras numa concentração de 1% foram dissolvidas em PBS, agitadas em vórtex e homogeneizadas em banho de ultrassom por 30 s por três vezes. Em seguida 300 µL dessa suspensão foram transferidos em quintuplicata aos poços da placa de poliestireno de alta aderência (Corning – Costar 3590). Após incubação a 4 °C durante 16-18 h, a placa foi lavada três vezes com 300 µL de PBS por poço.

O bloqueamento dos espaços não ocupados pelo produto e a prevenção de ligações inespecíficas se deu com 300 µL de BSA 1%, 4 °C, durante 1 h, seguida de lavagem com 300 µL de PBS por três vezes. Após crescimento da bactéria e devida diluição, foram adicionados aos poços 300 µL da suspensão bacteriana, a qual foram incubados durante 60 min a 37 °C para permitir sua ligação ao produto testado. Após

lavagem por seis vezes com 300 µl de PBS, para retirar as bactérias que não se ligaram ao produto, foi adicionado 200 µl de TSB, e uma gota de óleo de parafina, para que não haja evaporação do meio. Assim a placa foi incubada em leitor de microplacas TECAN Infinite M200 a 37 °C com leituras a cada 15 min a 690 nm, por 16 h.

O controle de ligação consistiu em poços contendo apenas o bloqueio com BSA e a bactéria sem adicionar o produto a ser testado. O controle de crescimento consistiu em poços previamente bloqueados com BSA, contendo uma solução de bactérias em meio TSB, de modo que se possa acompanhar algum problema durante o crescimento das bactérias. Brancos de cada amostra também foram plaqueados, estes consistiram em poços previamente bloqueados com BSA, contendo o produto a ser testado sem adição de bactérias. O produto comercial BioMos® da *Alltech* foi utilizado como um controle comercial. O esquema geral do ensaio do teste de ligação é apresentado na Figura 16.

5.5.1.4 Análise Estatística

A comparação entre os produtos foi realizada por meio da transformação do tempo necessário para alcançar a densidade óptica de 0,1 e a quantidade de bactérias ligadas. Os resultados foram submetidos também à análise de variância ANOVA (fator duplo ou fator único) e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados foram expressos como média + desvio padrão de no mínimo dois experimentos em quintuplicatas. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

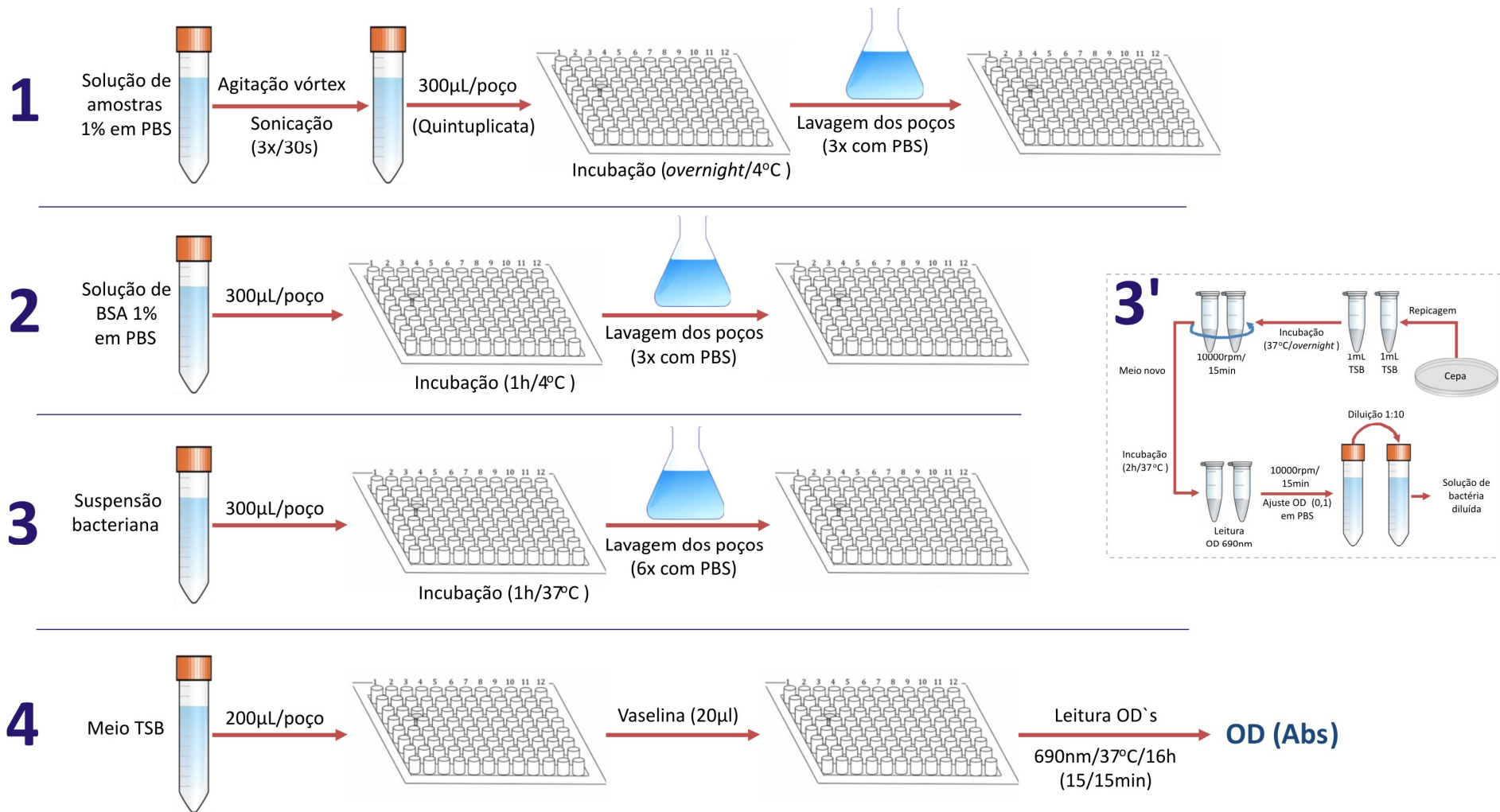


FIGURA 16 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO. 1) INCUBAÇÃO DA AMOSTRA DE INTERESSE; 2) BLOQUEIO DOS ESPAÇOS NÃO OCUPADOS PELAS AMOSTRAS E PREVENÇÃO DE LIGAÇÕES INESPECÍFICAS COM BSA; 3) INCUBAÇÃO DA ENTEROBACTÉRIA; 3') PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA A SER INCUBADA; 4) ADIÇÃO DO MEIO E LEITURA DAS DENSIDADES ÓPTICAS

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS EXTRATOS AQUOSOS DO FARELO DE SOJA

Cinco estratégias de extração do farelo da soja foram adotadas. A primeira envolveu extrações aquosas a frio (temperatura ambiente) e a quente (80 °C) de onde obteve-se os extratos nativos do farelo de soja. As outras extrações também foram aquosas sendo realizadas sob temperatura e pressão relativa controladas dando origem a polissacarídeos quimiotransformados em relação ao nativo. Desta forma, a fim de facilitar o entendimento, os resultados serão apresentados em grupos: primeiramente os obtidos a partir da extração de extratos nativos - estratégia 1, seguido dos resultados obtidos a partir das extrações de polissacarídeos quimiotransformados - estratégias 2 e 3, e por fim os resultados obtidos das estratégias 4 e 5.

6.1.1 Estratégia 1 – Extratos Nativos

6.1.1.1 Extração e Obtenção dos Extratos

Para obtenção de polissacarídeos nativos o farelo de soja foi submetido a uma primeira extração aquosa em temperatura ambiente, sob agitação mecânica (4 h). O conjunto resultante foi filtrado em um tecido fino (tecido *voil* liso) para remoção da maior parte do resíduo e o extrato líquido obtido foi centrifugado. Após centrifugação o sobrenadante (cujo volume foi reduzido, até uma terça parte, por evaporação sob pressão reduzida) foi tratado com etanol (três volumes), precipitando os polissacarídeos solúveis à temperatura ambiente. O precipitado foi recolhido, solubilizado em água e liofilizado gerando a fração FS-1 (10,3% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). O farelo de soja residual resultante da filtração e centrifugação foi submetido a uma segunda extração aquosa

a temperatura ambiente, sendo tratado de maneira idêntica ao descrito anteriormente. Esta segunda extração aquosa gerou a fração FS-2 (4,9% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja).

Sequencialmente, o farelo de soja residual foi submetido a duas extrações aquosas consecutivas a quente (80 °C, 4 h, agitação mecânica). Após a filtração com o tecido fino, o sobrenadante foi tratado de maneira idêntica à descrita anteriormente para o sobrenadante da extração a frio. As frações obtidas a partir da primeira e segunda extração a quente foram denominadas FS-3 e FS-4 (respectivamente 6,6 e 3,3% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja), respectivamente. O rendimento total dos extratos precipitados com etanol em relação ao peso seco do farelo de soja foi de 25,1%.

Os sobrenadantes etanólicos de todas as extrações foram concentrados, ressolubilizados em água e liofilizados, originando as frações FS-E1, FS-E2, FS-E3 e FS-E4 (respectivamente 9,5; 2,7; 0,9 e 0,4% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja).

6.1.1.2 Análise Químicas e de Composição Monossacarídica

Todas as frações obtidas foram analisadas comparativamente (Tabela 3) quanto à rendimento, teor de proteínas, teor de carboidratos totais, açúcares neutros e ácidos urônicos.

Os rendimentos das extrações variaram entre 3,4 – 13,3%, sendo as frações FS-3 e FS-1 as que apresentaram maior rendimento. Pode-se observar, que as frações apresentaram teor de carboidratos, variando entre 3,6 – 56,0%. As frações FS-1 e FS-E1 apresentaram os maiores teores de carboidratos 42,5 % e 56,0%, respectivamente, valores comparáveis aos descritos em literatura que se encontram próximos a 40% (BAINY *et al.*, 2008; GIANNOCCARO; WANG; CHEN, 2006). A extração sequencial dos carboidratos indicou que grande parte é extraída no primeiro ciclo da extração, os teores de carboidratos dos ciclos subsequentes são bem inferiores ao do primeiro.

TABELA 3 - ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS EXTRATOS NATIVOS OBTIDOS

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
FS-1	10,3	31,5	42,5	Tr	Tr	8,0	Tr	3,0	50,2	31,3	7,5
FS-2	9,7	66,0	8,2	1,5	Tr	24,2	3,8	9,6	23,4	10,7	26,8
FS-3	13,3	87,0	4,0	2,2	1,2	30,4	1,8	26,6	17,8	10,1	10,0
FS-4	3,4	87,2	3,6	2,3	1,7	17,4	3,5	6,6	16,2	27,3	25,0
FS-E1	9,5	7,4	56,0	Tr	Tr	3,1	Tr	4,0	27,8	49,2	15,9

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; FS-1, FS-2: Frações obtidas por extrações aquosas a 25°C; FS-3, FS-4: Frações obtidas por extrações aquosas a 80°C; FS-E1: Fração etanólica obtida por extração aquosa a 25°C; ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^b LOWRY *et al.* (1951); ^c DUBOIS *et al.* (1956); ^d Monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por CLG; ^e FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991); Tr: Traço ($\leq 1\%$).

Todas as frações apresentaram alto teor de proteínas, variando entre 31,5 – 87,2%. Observa-se que as frações obtidas a partir de extrações a quente (80 °C) - FS-3 e FS-4 - possuem altos teores de proteínas (87,0 e 87,2%, respectivamente) e baixos teores de carboidratos (4,0 e 3,6%, respectivamente), o que indica que a temperatura pode vir a facilitar a extração desse tipo de molécula.

As composições monossacarídicas das frações nativas extraídas a frio e a quente (FS-1, FS-2 e FS-4) apresentaram-se heterogêneas, com predominância de arabinose, galactose e glucose na maioria das frações. A fração FS-3, extraída a quente, apresentou-se com predominância de arabinose, manose e galactose. O extrato etanólico FS-E1 apresentou como açúcares principais a galactose e glucose.

É possível observar em todas as frações um alto teor de ácidos urônicos, representando totais entre 7,5 – 26,8% dos carboidratos. No presente trabalho não foi determinado o tipo de açúcar ácido, Aspinall *et. al.* (1967a) relata que o principal açúcar ácido presente na soja é do tipo ácido galacturônico.

6.1.1.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear

A análise comparativa entre FS-1, FS-2, FS-3 e FS-4 também foi realizada por RMN ¹³C (Figura 17). Observa-se, entre FS-1 a FS-4, um aumento na intensidade dos sinais característicos de proteínas: 10 a 55, 130, 170 a 180 ppm, correspondentes a cadeias laterais e ligações peptídicas, dupla ligação e grupos

carboxílicos de proteínas, respectivamente (ZERI *et al.*, 1996). É observada também a diminuição na intensidade dos sinais na região característica de carboidratos (60 a 110 ppm), sendo que nos espectros das frações FS-3 e FS-4 sinais referentes a carboidratos praticamente não são visualizados. Desta maneira, a fração FS-1, que contém menor teor de proteínas (31,5%) e maior teor de carboidratos (42,5%) quando comparada com as outras frações obtidas, foi escolhida para realização das análises subsequentes dos polissacarídeos nativos.

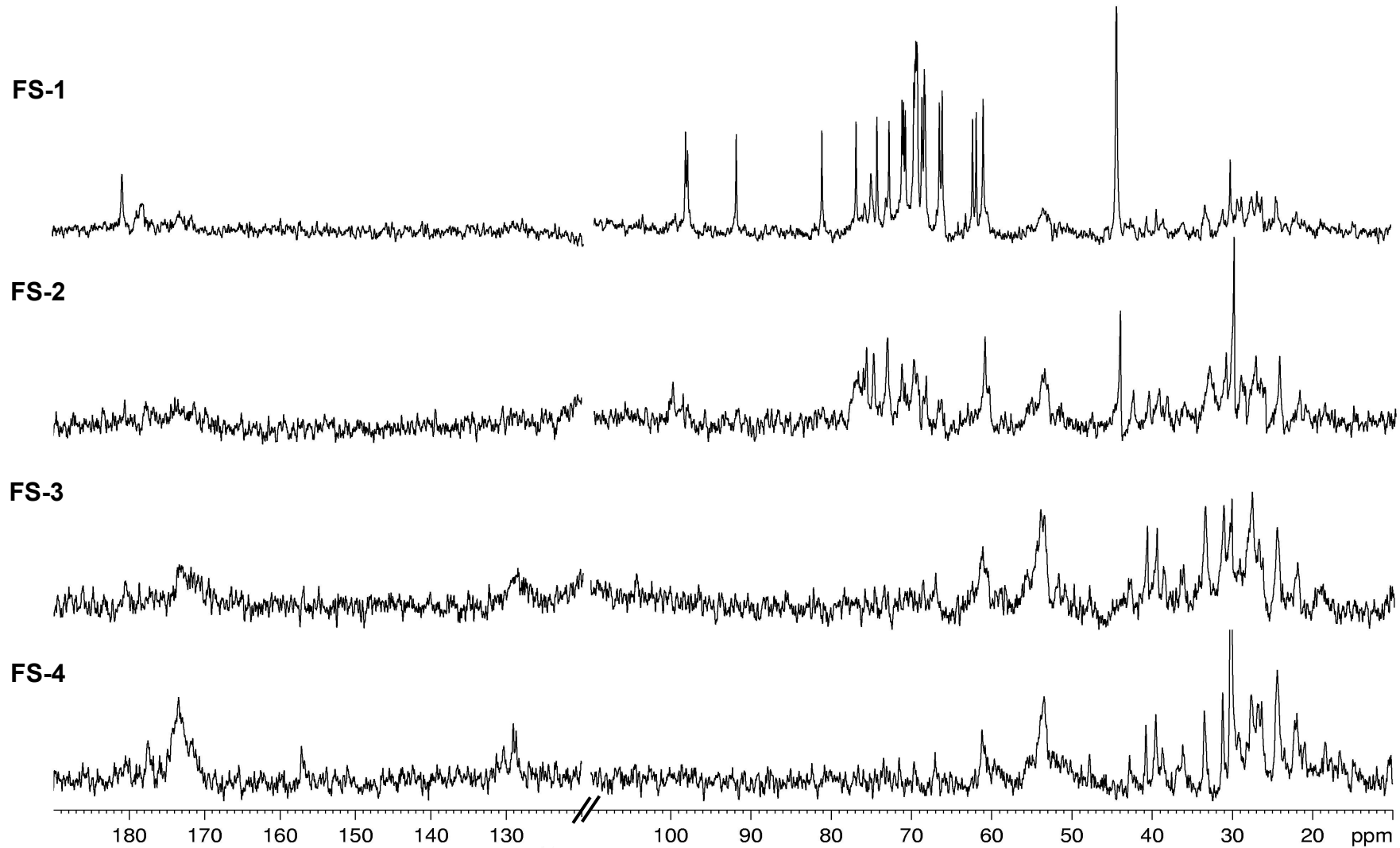


FIGURA 17 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DOS EXTRATOS NATIVOS OBTIDOS DA ESTRATÉGIA 1 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

A análise de RMN indicou na fração FS-1 a presença de sacarose (Figura 18). A sacarose (Figura 19) é um dissacarídeo bastante comum entre as espécies vegetais (FERREIRA; SILVA; PERRONE, 2001), formado por α -D-glcp - (1 \rightarrow 2) - β -D-fruf (NELSON; COX, 2006). Desta forma a região anomérica (90 - 110 ppm) mostra deslocamentos químicos em 92,1 e 103,7 ppm, referentes ao C-1 das unidades de α -D-glcp e ao C2 das unidades de β -D-fruf, respectivamente. Deslocamentos em 71,2; 73,0; 69,6 e 61,2 ppm correspondem ao C-2, C-3/C-5, C-4 e C-6 das unidades α -D-glcp, respectivamente. Os sinais correspondentes aos C-1, C-3, C-4, C-5 e C-6 das unidades de β -D-fruf ressonaram em 62,5; 77,1; 74,5; 81,4 e 62,1 ppm, respectivamente. Os carbonos do tipo -CH₂ foram assinalados com base no espectro de RMN DEPT 135 cujos sinais de tais carbonos aparecem invertidos (Figura 18 - detalhe).

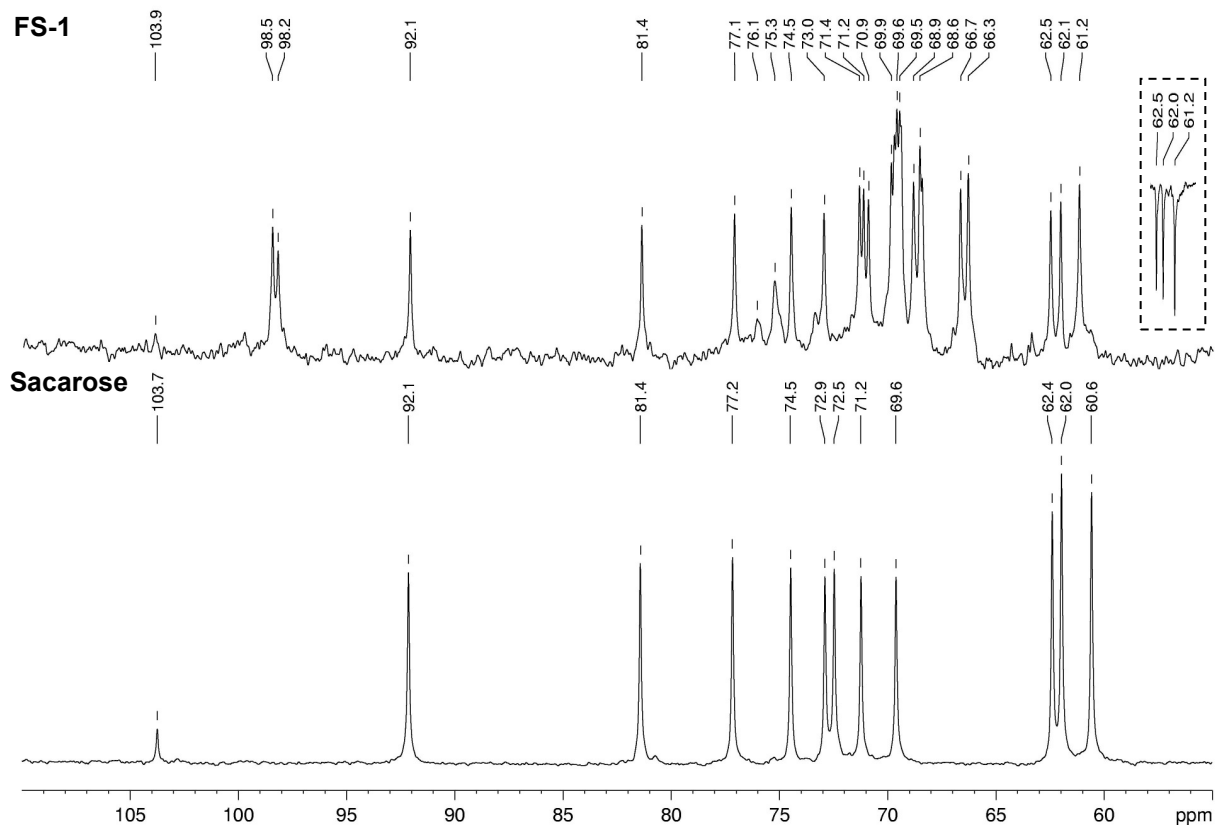


FIGURA 18 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE CARBOIDRATOS (110 – 55 PPM) DOS ESPECTROS DE RMN ¹³C DA FRAÇÃO FS-1 OBTIDA NA ESTRATÉGIA 1 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA E DO PADRÃO DE SACAROSE. EM DETALHE, REGIÕES DE -CH₂ DO ESPECTRO DE DEPT 135

Solvente: D₂O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

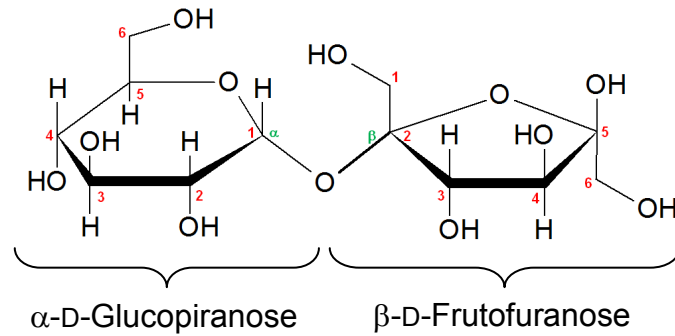


FIGURA 19 - ESTRUTURA DA SACAROSE
 FONTE: O AUTOR

O espectro de ressonância magnética nuclear da fração FS-E1 (Figura 20) apresentou-se bastante semelhante ao da fração FS-1, mostrando sinais que comprovam novamente a presença de sacarose. Estes dados corroboram com as composições monossacarídicas já descritas, uma vez que a glucose está entre os açúcares majoritários dessas frações. É importante destacar, que, nas condições de hidrólise utilizadas, as unidades de frutose são degradadas, não sendo detectadas por CLG. A presença da sacarose em ambas as frações sugere que houve a coprecipitação deste dissacarídeo durante a precipitação de macromoléculas com etanol. Isto pode ter acontecido em decorrência de uma solução altamente concentrada, de modo que o etanol não foi eficiente na separação dos polissacarídeos e oligossacarídeos.

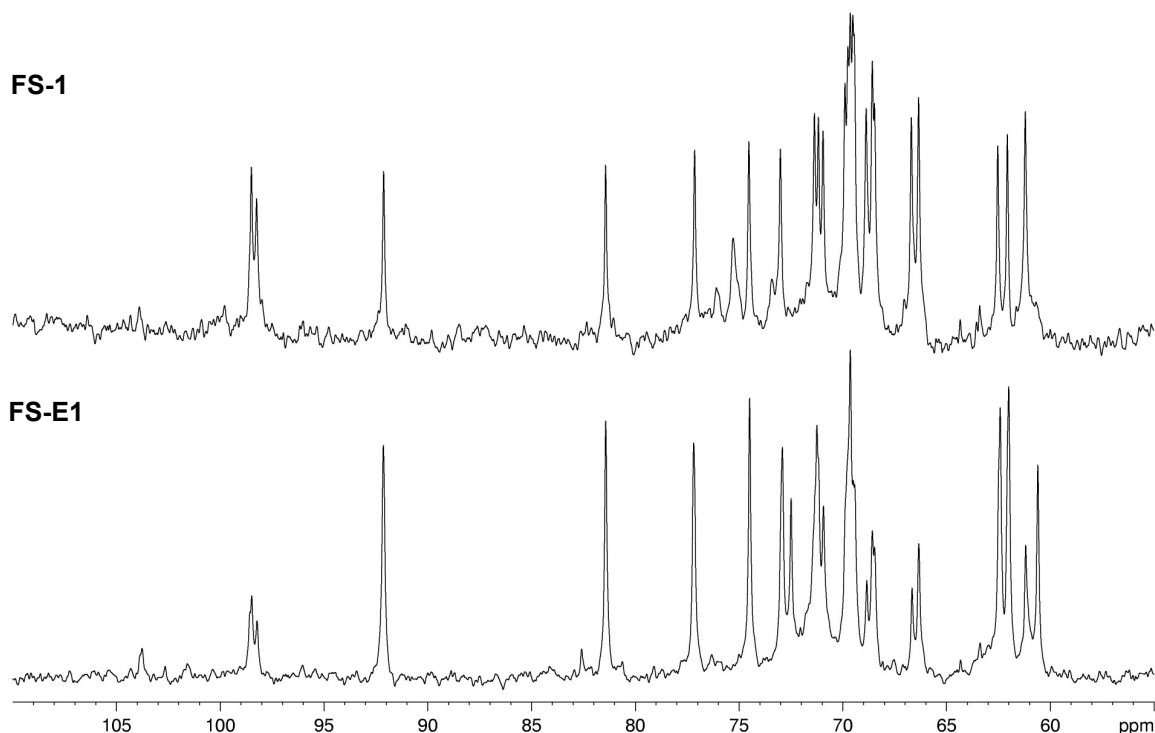


FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES FS-1 E FS-E1 OBTIDAS DA ESTRATÉGIA 1 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

6.1.1.4 Purificação da fração FS-1

6.1.1.4.1 Tratamento com TCA

Com o objetivo de purificar os polissacarídeos brutos, a fração FS-1 foi submetida ao tratamento com ácido tricloroacético (TCA), com o intuito de provocar a precipitação das proteínas.

Após solubilização de aproximadamente 10 g da fração FS-1 em 100 mL de água destilada, esta foi adicionada de 16,7 mL de uma solução de TCA (80% p/v). As misturas foram então homogeneizadas e, na sequência, centrifugadas. Os sobrenadantes e precipitados obtidos foram neutralizados, dialisados e liofilizados, originando as frações FS-1Ts (9,3% de rendimento em relação à massa seca recuperada no tratamento) e FS-1Tp (90,7% de rendimento em relação à massa seca recuperada no tratamento), respectivamente (Tabela 4). Notou-se também que

compostos de baixa massa molecular e sacarose presentes na fração mãe foram eliminados durante o processo de diálise, apenas 30% do peso inicial da massa submetida ao tratamento foi recuperada. Esta baixa taxa de recuperação está de acordo com o elevado teor de sacarose presente no extrato que foi eliminado no processo de diálise.

TABELA 4 - ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVAS E APÓS TRATAMENTO COM TCA

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
FS-1	10,3	31,5	42,5	Tr	Tr	8,0	Tr	3,0	50,2	31,3	7,5
FS-1Ts	9,3	25,7	13,7	13,6	5,0	3,4	5,0	8,7	11,8	19,6	32,8
FS-1Tp	90,7	84,2	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; FS-1: Fração obtida por extração aquosa a 25°C; FS-1Ts: Fração solúvel obtida após tratamento de FS-1 com TCA 80% (p/v); FS-1Tp: Fração insolúvel obtida após tratamento de FS-1 com TCA 80% (p/v); ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^b LOWRY *et al.* (1951); ^c DUBOIS *et al.* (1956); ^d Monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por CLG; ^e FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991); Tr: Traço ($\leq 1\%$); -: Não determinado.

Como pode ser observado na tabela acima, o teor de proteínas foi reduzido de 31,5% (FS-1) para 25,7% (FS-1Ts). A fração FS-1Tp concentrou um alto teor de proteínas, 84,2%, indicando que o tratamento com TCA foi capaz de precipitá-las. Porém, além do tratamento com TCA, não ter reduzido significativamente o teor de proteínas, como era o objetivo inicial, as características de solubilidade da amostra foram alteradas, em decorrência do tratamento, tornando-a bastante insolúvel. Esta insolubilidade dificultou as análises químicas e de composição monossacarídica, portanto estes resultados devem ser considerados com parcimônia. Em relação a composição monossacarídica nota-se que o teor de glucose se reduziu, confirmando a hipótese de que a sacarose foi eliminada durante a diálise.

Desta forma foi necessário testar outras técnicas para conseguir purificar a fração FS-1.

6.1.1.4.2 Diálise em sistema fechado

Visto que a sacarose era eliminada durante a diálise no tratamento com TCA, optou-se por submeter à fração FS-1 a diálise em sistema fechado, contra água destilada, em membrana com tamanho de poro de 2000 Da.

Após dissolver a amostra (500 mg/5 mL de água destilada), esta foi submetida à diálise contra água destilada, em membrana de 2000 Da, em sistema fechado. As trocas de água foram realizadas em média a cada 4 h por três vezes. Após a diálise a fração retida foi liofilizada e denominada de FS-1d (33,0% de rendimento em relação à massa seca inicial ao tratamento). A fração eluída na água da diálise foi concentrada e liofilizada a fim de observar se apenas a sacarose e compostos de baixa massa foram eliminados.

Observa-se através da Tabela 5 que a fração FS-1d, devido a eliminação da sacarose, reduz seu teor de carboidratos totais, passando de 42,5% (FS-1) para 13,4%. Esse resultado indica que a sacarose era um dos componentes majoritários na fração anterior ao processo de diálise. Outra informação que vem a confirmar esta hipótese é o teor de glucose, que é reduzido de 31,3 mol% (FS-1) para 8,7 mol% (FS-1d).

TABELA 5 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO NATIVA E APÓS DIÁLISE

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
FS-1	10,3	31,5	42,5	Tr	Tr	8,0	Tr	3,0	50,2	31,3	7,5
FS-1d	33,0	86,6	13,4	7,8	2,5	16,8	3,2	17,5	18,7	8,7	24,9

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; FS-1: Fração obtida por extração aquosa a 25°C; FS-1d: Fração retida após diálise de FS-1 em membrana de 2kDa; ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de a inicial; ^b LOWRY *et al.* (1951); ^c DUBOIS *et al.* (1956); ^d Monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por CLG; ^e FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991); Tr: Traço ($\leq 1\%$).

Devido à eliminação da sacarose e compostos de baixa massa, o teor de proteínas aumentou significativamente, passando de 31,5% (FS-1) para 86,6% (FS-1d). Estes dados podem ser confirmados através do espectro de RMN de ¹³C destas frações (Figura 21), onde é possível observar que houve a eliminação da sacarose e

compostos de baixa massa, através do espectro da água da diálise de FS-1d, e a concentração de proteínas através no espectro da fração FS-1d.

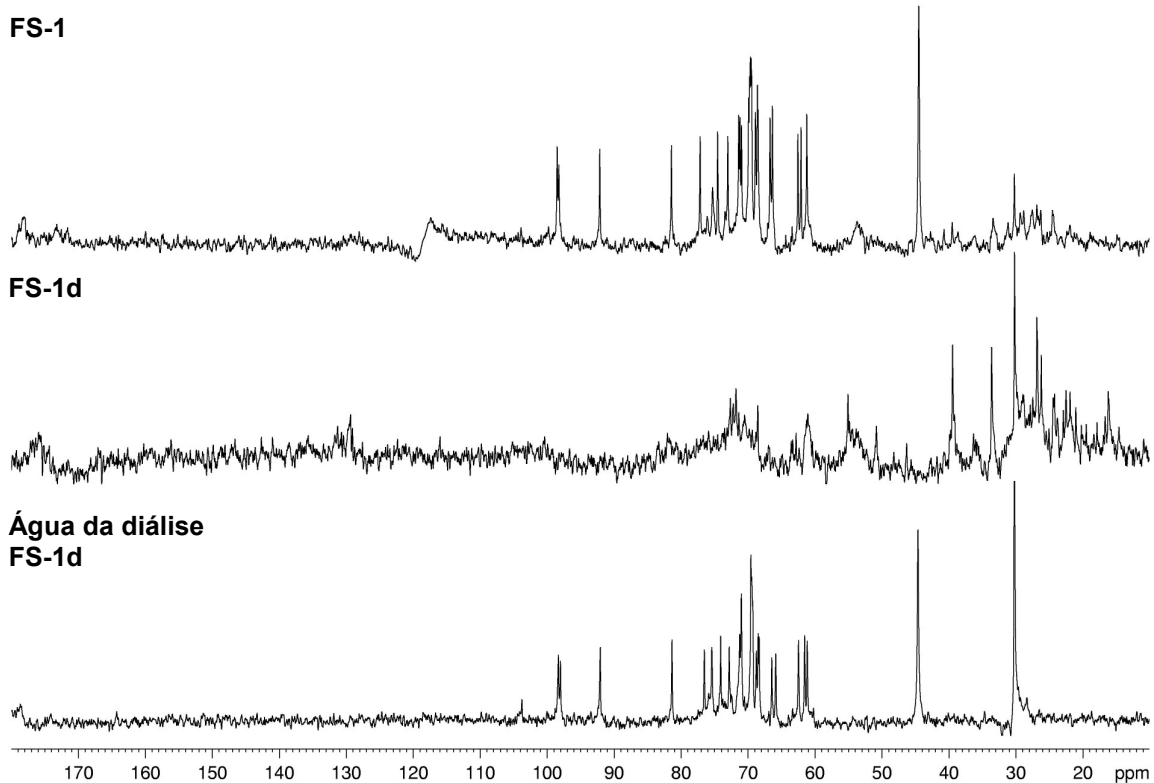


FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN ¹³C DAS FRAÇÕES FS-1, FS-1d E ÁGUA DA DIÁLISE DE FS-1d

Solvente: D₂O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

6.1.1.4.3 Tratamento enzimático

A fração FS-1d apresentou alto conteúdo de proteínas, como já comentado anteriormente (Tabela 5). Com o objetivo de purificar esta fração, eliminando as proteínas, e conseqüentemente, aumentando o teor de carboidratos, esta foi tratada com uma protease (Pronase E). Para tanto a amostra (100 mg) foi dissolvida em tampão fosfato e após período de incubação foi dialisada contra água destilada, em membrana de 2000 Da, e liofilizada, resultando na fração FS-1te (23,8% de rendimento em relação à massa seca inicial ao tratamento). Devido a baixa solubilidade e baixo rendimento, esta fração foi reservada para os testes biológicos, não sendo realizadas outras análises.

6.1.1.5 Análise por HPSEC-MALLS-RID

A fração FS-1 e suas derivadas FS-1Ts e FS-1d foram submetidas a análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-RID).

Através do detector de índice de refração é possível visualizar que as frações FS-1 (Figura 22) e FS-1d (Figura 23) mostraram perfil cromatográfico heterogêneo, indicando a presença de massas moleculares diferentes, eluindo após os 55 min. Pode-se observar também que o detector de espalhamento de luz não detectou moléculas de elevada massa molar. Isso indica a presença apenas de moléculas de baixa massa molar, não detectáveis pelos detectores multiângulos, fato este que já era presumido considerando a eluição ter acontecido após os 55 min.

Na Figura 24 são apresentados os perfis de eluição das frações FS-1 e FS-1d comparadas ao padrão de sacarose. De acordo com o detector de índice de refração, o tempo de retenção do padrão de sacarose é ≈ 65 min. A sacarose elui no mesmo tempo de retenção que um dos picos da fração FS-1, o que não ocorre com a fração FS-1d, indicando desta forma a presença de sacarose na fração nativa e comprovando sua eliminação na fração dialisada.

Na Figura 25 é apresentado o perfil de eluição da fração FS-1Ts. O pico centrado em ≈ 39 min foi detectado pelo detector de espalhamento de luz indicando que este é constituído por moléculas de alta massa molar, porém encontra-se em baixa concentração, motivo este pelo qual não é detectado pelo detector de índice de refração. Pode se observar ≈ 60 min um pico referente a absorção em UV (280 nm), indicando a eluição das proteínas detectadas analiticamente (25,7% - Tabela 4). Estas proteínas podem estar livres e/ou ligadas aos carboidratos na forma de glicoproteínas e/ou proteoglicanos. Os picos centrados entre 60 e 65 min foram detectados apenas pelo detector de índice de refração, indicando a presença de moléculas com relativamente baixa massa molar.

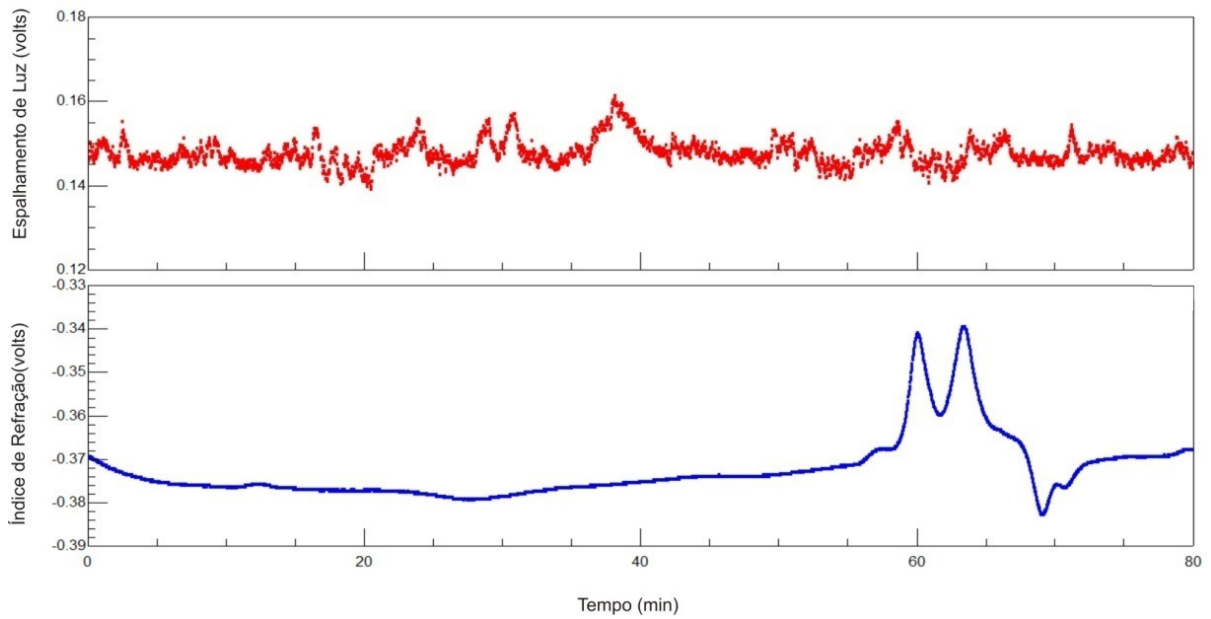


FIGURA 22 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO FS-1

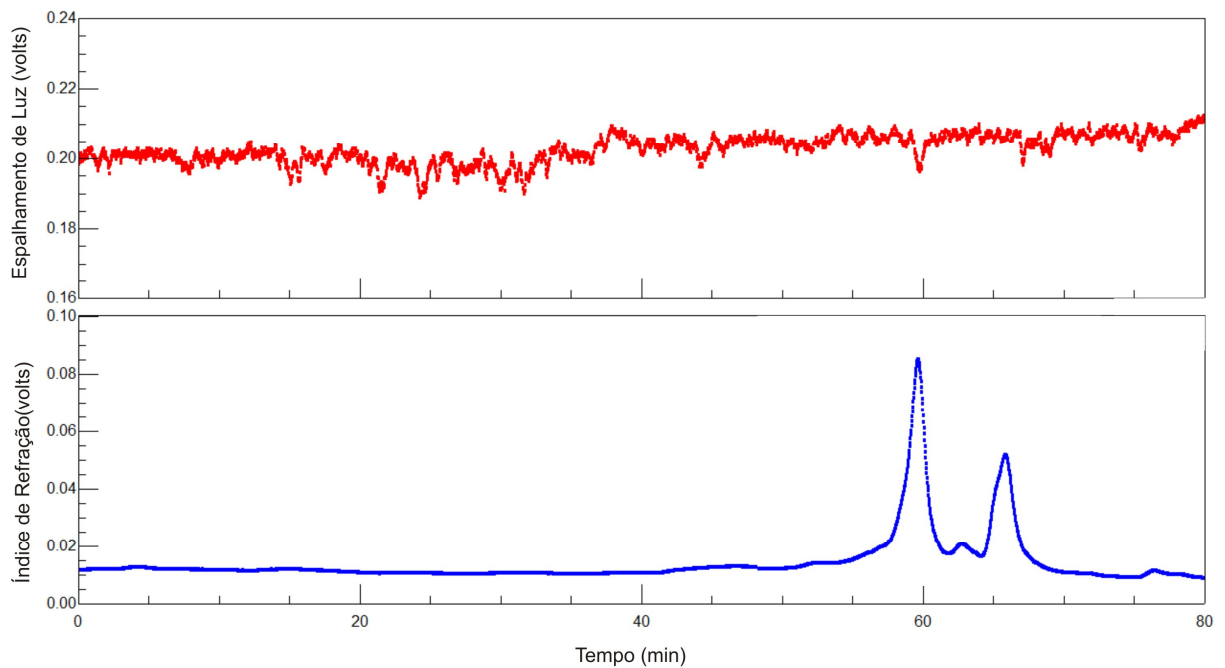


FIGURA 23 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO FS-1d

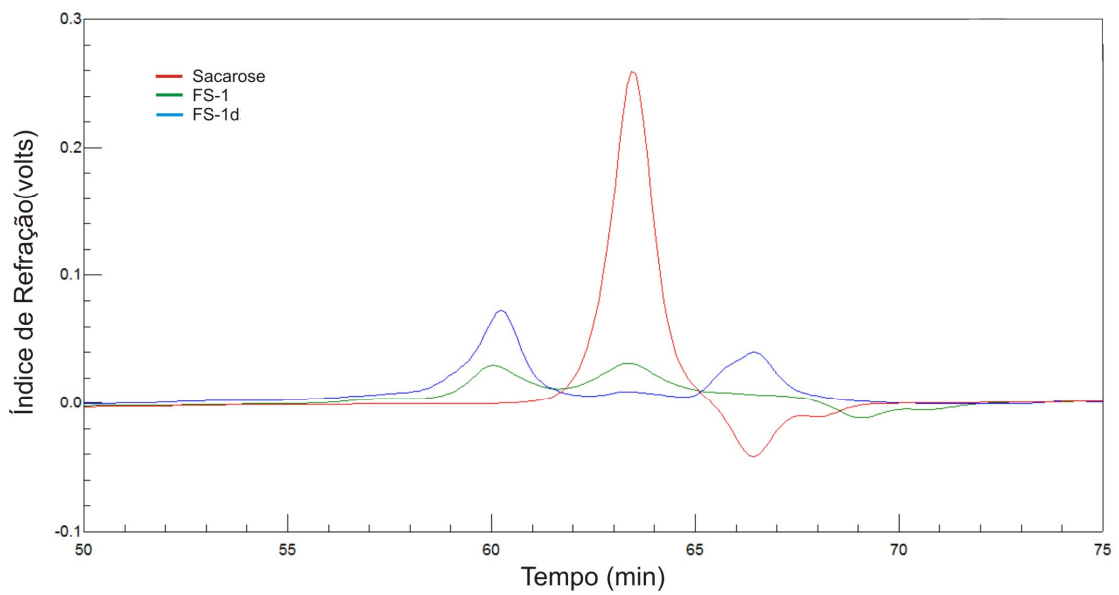


FIGURA 24 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES FS-1, FS-1d EM COMPARAÇÃO COM PADRÃO DE SACAROSE

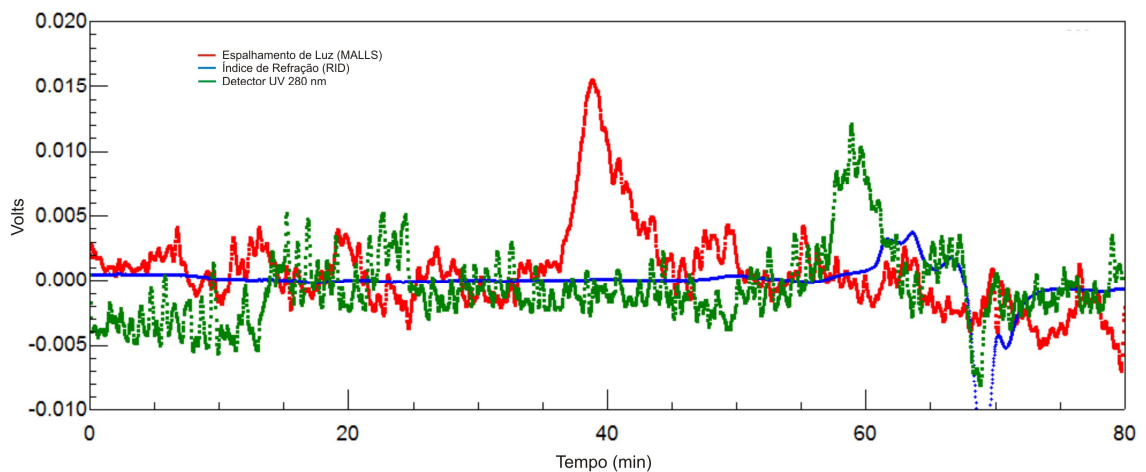


FIGURA 25 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO FS-1Ts

6.1.2 Estratégia 2 e 3 – Polissacarídeos Quimiotransformados

6.1.2.1 Extração e Obtenção dos Polissacarídeos

A estratégia 2 para extração teve como objetivo a modificação química dos polissacarídeos (quimiotransformação). O farelo de soja foi pesado e diluído em água destilada numa concentração de 15 g%. O pH inicial da solução (6,5) foi ajustado à pH 2,0 com adição de HCL 1 M e a solução foi submetida a uma pressão relativa de 1 atm, 121 °C por 1 h (processo de autoclavação). Após o tratamento o material foi filtrado rendendo uma fração retida e uma filtrada. A fração retida foi liofilizada gerando a fração EAF-AR (26,4% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). A fração filtrada foi neutralizada, centrifugada e novamente submetida ao processo de autoclavação por mais 15 min. Após dialisada e liofilizada originou a fração EAF-A (13,4% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). O material retido durante a filtração foi dialisado e originou a fração EAF-AP (14,1% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja).

A fim de variar as condições da estratégia 2 estabeleceu-se uma terceira estratégia. O farelo de soja foi pesado e diluído em água destilada numa concentração de 15 g%. O pH inicial da solução (6,5) foi ajustado à pH 7,0 com adição de NaOH 0,5 M e a solução foi submetida a uma pressão relativa de 1 atm, 121 °C por 1 h (processo de autoclavação). Após o tratamento o material foi filtrado rendendo uma fração retida e uma filtrada. A fração retida foi liofilizada gerando a fração EAF-NR (57,8% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). A fração filtrada foi neutralizada, centrifugada e novamente submetida ao processo de autoclavação por mais 15 min. Após dialisada e liofilizada originou a fração EAF-N (14,0% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). O material retido durante a filtração foi dialisado e originou a fração EAF-NP (1,5% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja).

6.1.2.2 Análises Químicas e de Composição Monossacarídica das frações obtidas

Todas as frações obtidas foram analisadas comparativamente (Tabela 6) quanto à rendimento, teor de proteínas, teor de carboidratos totais e composição monossacarídica.

TABELA 6 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS ESTRATÉGIAS 2 E 3

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
Estratégia 2											
EAF-A	13,4	59,8	30,8	3,5	1,2	19,8	6,2	1,2	31,7	5,5	30,8
EAF-AP	14,1	77,7	11,3	3,3	1,3	14,9	5,9	11,0	19,4	12,3	31,9
Estratégia 3											
EAF-N	14,0	57,2	16,5	2,8	1,1	33,7	4,5	3,5	19,0	6,4	29,1
EAF-NP	1,5	55,3	18,3	1,5	Tr	28,5	6,4	5,6	20,0	32,5	5,5

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; EAF-A: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 2 (extração ácida); EAF-AP: Fração insolúvel obtida a partir da Estratégia 2; EAF-N: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 3 (extração neutra); EAF-NP: Fração insolúvel obtida a partir da Estratégia 3; ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^b LOWRY *et al.* (1951); ^c DUBOIS *et al.* (1956); ^d Monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por GLC; ^e FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991); Tr: Traço ($\leq 1\%$).

Os rendimentos das extrações variaram entre 1,5 – 14,1%, sendo as frações EAF-AP e EAF-N as que apresentaram maior rendimento. Pode-se observar, pela tabela acima, que as frações apresentaram teor de carboidratos, variando entre 11,3 – 30,8%. A fração EAF-A foi a que apresentou o maior teor, 30,8%, valor este comparável ao descrito por Bainy *et al.* (2008) e Giannoccaro, Wang e Chen (2006) para farelo de soja que se encontra próximo a 40%. Possivelmente essa alta variação entre as amostras quanto ao teor de carboidratos ocorre devido às diferenças nas estratégias de extração, podendo estas facilitar ou não a extração de carboidratos. As frações apresentaram alto teor de proteínas, variando entre 55,3 – 77,7%. Segundo Bainy *et al.* (2008) o teor de proteínas do farelo de soja bruto se encontra em torno de 50%, portanto resultados altos encontrados já eram esperados.

As composições monossacarídicas da maioria das frações obtidas apresentaram arabinose, galactose e ácidos urônicos como constituintes monossacarídicos majoritários, o que sugere a presença de pectinas no farelo de soja. Em algumas das frações a glucose aparece em quantidades significativas. Outros monossacarídeos são encontrados em menores quantidades (Tabela 6).

As frações EAF-A, EAF-AP e EAF-N apresentam como principais monossacarídeos neutros arabinose e galactose. A fração EAF-NP, além da arabinose e galactose, apresentou teor elevado de glucose. A fração EAF-AP, além de galactose e arabinose, apresentou alto teor de glucose e manose.

É possível observar em todas as frações um alto teor de ácidos urônicos, representando totais entre 5,5 – 30,8% dos carboidratos.

6.1.2.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear

Comparando-se os espectros de RMN ^{13}C entre EAF-A e EAF-AP (Figura 26), confirma-se uma similaridade de sinais. É possível visualizar sinais característicos de carboidratos (110 – 60 ppm) e proteínas (10 a 55, 130, 170 a 180 ppm) como os observados nos espectros dos extratos nativos obtidos a partir do farelo de soja (Item 6.1.1.3). Em razão da fração EAF-A apresentar um conteúdo de carboidratos superior a EAF-AP (30,8 e 11,3%, respectivamente), esta foi escolhida para realização das análises subsequentes dos polissacarídeos quimiotransformados.

Da mesma forma, as frações EAF-N e EAF-NP foram comparadas através de seus espectros de RMN ^{13}C (Figura 27). É possível visualizar, novamente, sinais característicos de proteínas, assim como os observados nos espectros anteriores, bem como sinais característicos de presença de carboidratos. A fração EAF-N apresentou um rendimento superior a EAF-NP (14,0 e 1,5%, respectivamente), por esta razão também foi escolhida para realização das análises subsequentes dos polissacarídeos quimiotransformados.

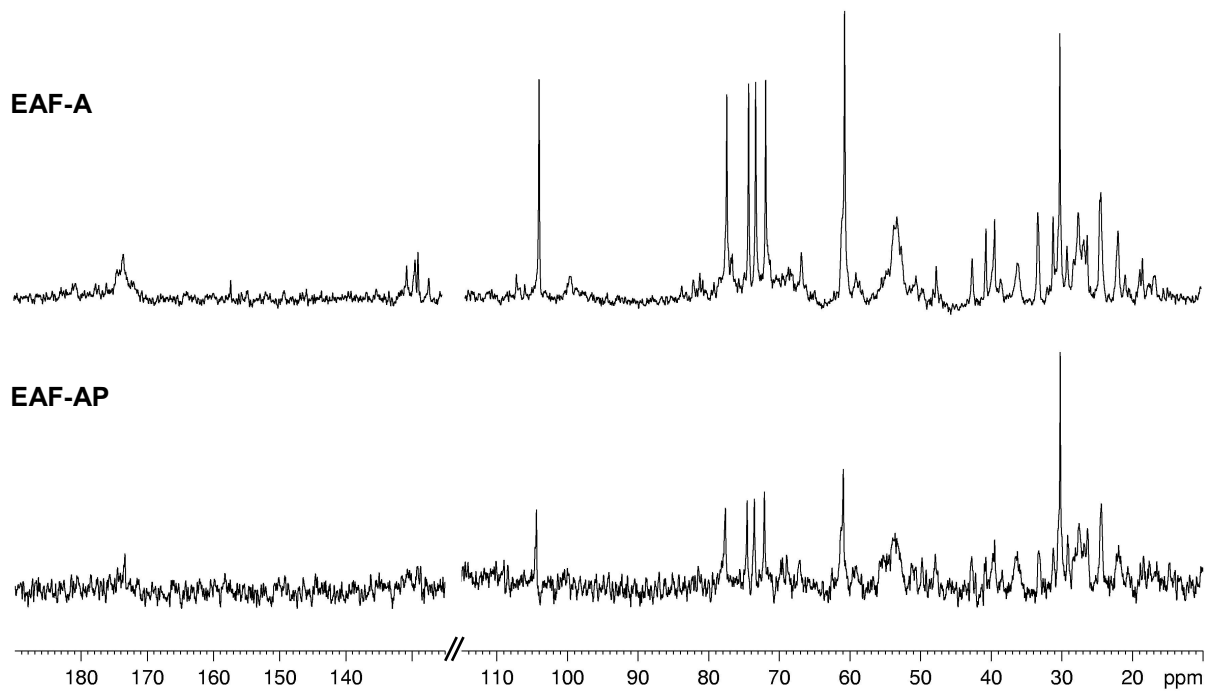


FIGURA 26 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA ESTRATÉGIA 2 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

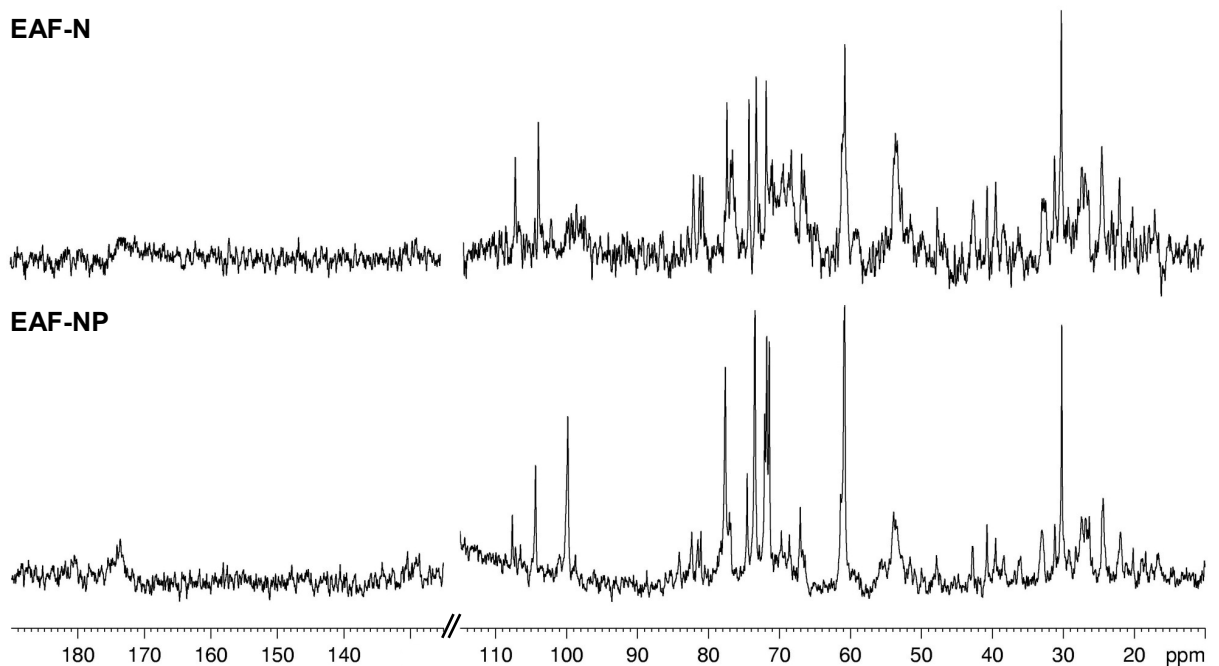


FIGURA 27 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA ESTRATÉGIA 3 DE EXTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Na Figura 28 são comparados os espectros de RMN ^{13}C das frações EAF-A e EAF-N. A região anomérica (110 – 90 ppm) apresenta dois sinais principais em

107,6 e 104,4-104,3 ppm. O sinal em 107,6 ppm pode ser atribuído ao C-1 das unidades de α -L-Araf (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; CAPEK *et al.*, 2010; GOLLNER; BLASCHEK; CLASSEN, 2010). Os sinais em 104,3 e 104,4 ppm referem-se ao C-1 das unidades de β -D-Galp (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; LIMA, 2008). São observados sinais em 77,6; 74,5; 73,5; 72,1; 60,9 ppm, correspondentes ao C-4, C-5, C-3, C-2 e C-6, respectivamente, das unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-ligadas (GORIN; MAZUREK, 1975; FRANSEN *et al.*, 2000; LIMA, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009). Sinais em 82,3; 81,4; 81,0 ppm podem ser atribuídos a C-2, C-3 ou C-4, das unidades de α -L-Araf e em 67,0 ppm ao C-5 substituído das unidades de α -L-Araf (1 \rightarrow 5) ligadas (FRANSEN *et al.*, 2000; CAPEK *et al.*, 2010).

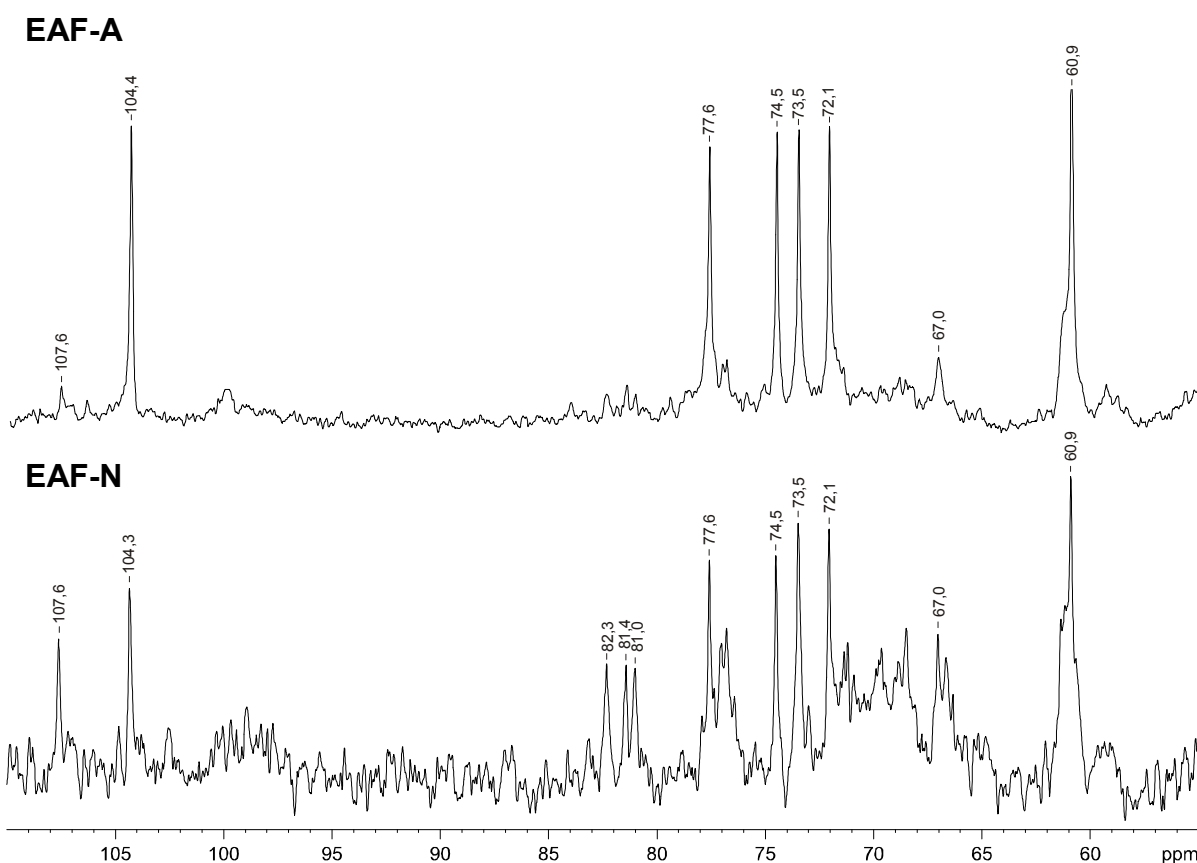


FIGURA 28 - ESPECTROS DE RMN ¹³C DAS FRAÇÕES EAF-A e EAF-N
Solvente: D₂O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Através do espectro de ¹³C dessas duas frações, pode-se observar sinais mais intensos, correspondentes a unidades α -L-Araf, na fração EAF-N, isto pode ser explicado devido a labilidade dessas unidades em pHs baixos. Para obtenção da fração EAF-A, o pH foi reduzido até pH 2,0, o que facilita a hidrólise das unidades

furanosídicas de arabinose. Desta forma quando a extração é feita a pH 7,0 (EAF-N), as unidades não são quebradas e conseqüentemente aparecem em maiores proporções. Estes resultados confirmam que as condições utilizadas na estratégia 2 modificaram a estrutura dos polissacarídeos isolados do farelo de soja.

Cabe destacar ainda a importância do processo de autoclavação para a extração de polissacarídeos. Na estratégia 1, onde foi realizada extração aquosa à 80 °C e pH neutro, polissacarídeos não foram extraídos, diferentemente do que ocorreu na estratégia 3, onde a extração aquosa foi realizada a 121 °C, 1 atm, pH neutro. Desta forma é possível afirmar que a autoclavação (121 °C, 1 atm) facilita a extração de polissacarídeos em pH neutro.

6.1.2.4 Purificação das frações EAF-A e EAF-N

6.1.2.4.1 Tratamento com TCA

Com o objetivo de purificar os polissacarídeos brutos, as frações EAF-A e EAF-N foram submetidas ao tratamento com ácido tricloroacético (TCA), com o intuito de provocar a precipitação das proteínas. Após solubilização de aproximadamente 10 g das frações em água destilada, estas foram adicionadas de uma solução de TCA (80% p/v). As misturas foram então homogeneizadas e centrifugadas. Os sobrenadantes e precipitados obtidos foram neutralizados, dialisados e liofilizados. Originando as frações EAF-ATs e EAF-NTs, correspondentes aos sobrenadantes, e as frações EAF-ATp e EAF-NTp correspondentes aos precipitados (Tabela 7).

Para a fração EAF-A, da massa total submetida ao tratamento, 62,8% foram recuperadas, já para a fração EAF-N este valor foi de 89,3%. As taxas de recuperação indicam que pode ter havido hidrólise da molécula, gerando fragmentos de baixa massa que podem ter sido eliminados durante o processo de diálise.

Como pode ser observado na Tabela 7, o teor de proteínas foi reduzido de 59,8% (EAF-A) para 35,3% (EAF-ATs). Para a fração EAF-N o teor de proteínas foi reduzido de 57,2% para 25,0% (EAF-NTs). As frações EAF-ATp e EAF-NTp

concentraram alto teor de proteínas 95,0 e 89,3%, respectivamente, indicando que o tratamento com TCA foi eficaz na precipitação das proteínas, mas não suficiente para desproteínizar as frações sobrenadantes.

TABELA 7 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS NAS ESTRATÉGIAS 2 E 3 E APÓS TRATAMENTO COM TCA

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
Estratégia 2											
EAF-A	13,4	59,8	30,8	3,5	1,2	19,8	6,2	1,2	31,7	5,5	30,8
EAF-ATs	53,4	35,3	52,5	1,9	0,5	5,0	5,1	0,6	5,9	0,7	80,2
EAF-ATp	46,6	95,0	7,0	-	-	-	-	-	-	-	38,9
Estratégia 3											
EAF-N	14,0	57,2	16,5	2,8	1,1	33,7	4,5	3,5	19,0	6,4	29,1
EAF-NTs	18,1	25,0	57,2	2,5	1,3	26,9	5,0	2,0	16,9	1,0	44,2
EAF-NTp	81,9	89,3	6,1	-	-	-	-	-	-	-	16,4

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; EAF-A: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 2 (extração ácida); EAF-ATs: Fração solúvel obtida após tratamento de EAF-A com TCA 80% (p/v); EAF-ATp: Fração insolúvel obtida após tratamento de EAF-A com TCA 80% (p/v); EAF-N: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 3 (extração neutra); EAF-NTs: Fração solúvel obtida após tratamento de EAF-N com TCA 80% (p/v); EAF-NTp: Fração insolúvel obtida após tratamento de EAF-N com TCA 80% (p/v); ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^b LOWRY et. al. (1951); ^c Determinado pelo método de DUBOIS et. al. (1956); ^d Monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por GLC; ^e FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991); -: Não determinado.

Em relação à composição monossacarídica nota-se que o teor de ácidos urônicos na fração EAF-ATs aumentou significativamente, passando de 30,8% (EAF-A) para 80,2%. Em consequência, os monossacarídeos neutros apresentaram-se diminuídos. A proporção de UA:Ara:Gal passou de 1,6:1:1,6 para 16:1:1,2, indicando uma diminuição nos teores de arabinose e galactose, e consequente aumento relativo dos ácidos urônicos. Esses dados podem demonstrar novamente que pode ter havido hidrólise da cadeia polissacarídica. A composição monossacarídica da fração EAF-NTs mostrou-se bastante semelhante a sua matriz, onde a galactose e a arabinose são os monossacarídeos majoritários.

A fração EAF-ATs foi também submetida à análise de RMN (Figura 29) e comparada a sua fração mãe EAF-A. Destaca-se a redução do sinal em 104,4 ppm referente às unidades de β -D-Galp (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; LIMA, 2008); e sinais mais evidentes em 106,4 e 107,6 ppm atribuídos às unidades de α -L-Araf (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; CAPEK *et al.*, 2010;

GOLLNER; BLASCHEK; CLASSEN, 2010). Também é possível identificar o surgimento de sinais correspondentes à unidades de α -D-GalpA (100,1 e 99,2 ppm, respectivos ao C-1 das unidades esterificadas e não esterificadas) (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008) e unidades de β -D-Xylp (103,5 e 65,2 ppm respectivos ao C-1 e C-5) (SIMAS *et al.*, 2004; USOV; BILAN; SHASHKOV, 2007). Foi possível observar também sinal em 173,5 ppm referente aos grupamentos -COOH do ácido galacturônico (DELGOBO *et al.*, 1999; CIPRIANI *et al.*, 2004). Esses dados corroboram com os dados de composição monossacarídica, onde os teores de ácidos urônicos aumentaram, sugerindo a presença de uma galacturonana substituída por unidades de arabinose, galactose e xilose.

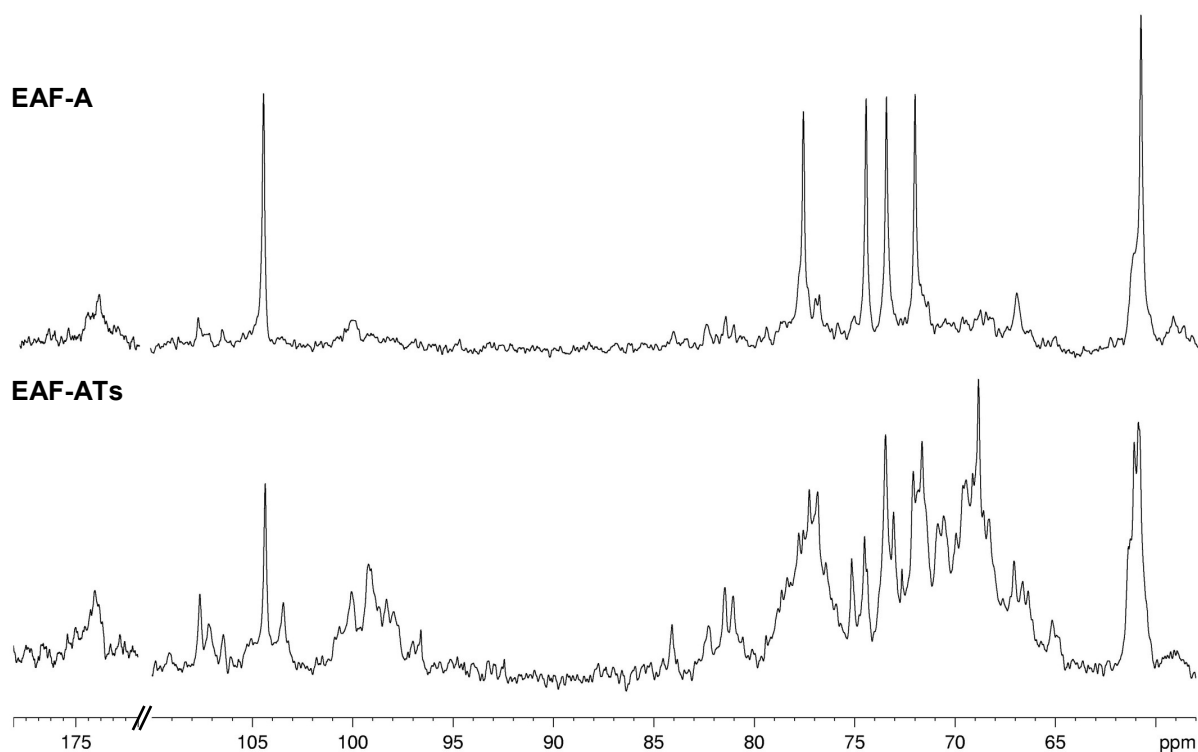


FIGURA 29 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-A E EAF-ATs
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

A fração EAF-NTs foi também submetida à análise de RMN (Figura 30) e comparada a sua fração mãe EAF-N. A fração com tratada com TCA mostrou-se similar a sua original, porém o espectro apresentou uma maior resolução. Podem ser visualizados sinais bem definidos correspondentes ao C-1 das unidades de α -L-Araf (107,6; 107,1 e 106,4 ppm), β -D-Galp (104,4 ppm) e α -D-GalpA (100,1 e 99,0 ppm) (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; WANG; LIU; FANG, 2005;

COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008; LIMA, 2008; CAPEK *et al.*, 2010; GOLLNER; BLASCHEK; CLASSEN, 2010). Foi possível observar também o sinal referente ao grupamento –COOH do ácido galacturônico em 173,5 ppm (DELGOBO *et al.*, 1999; CIPRIANI *et al.*, 2004).

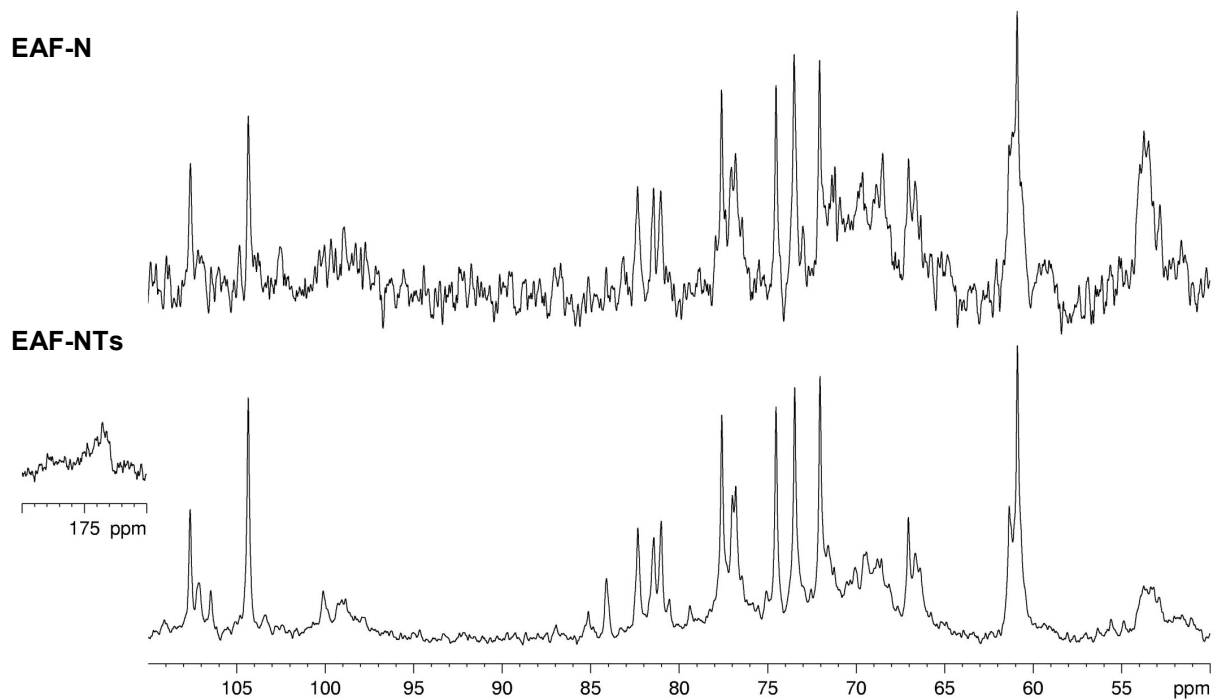


FIGURA 30 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-N E EAF-NTs
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Considerando que as amostras tratadas com TCA ainda apresentam altos teores de proteínas foi necessário testar outras técnicas para conseguir desproteinizar as frações EAF-A e EAF-N.

6.1.2.4.2 Tratamento Enzimático

As frações EAF-A e EAF-N apresentam alto conteúdo de proteínas (Tabela 6), e o tratamento com TCA não foi suficientemente efetivo. Com o objetivo de purificar estas frações, eliminando as proteínas e, conseqüentemente, aumentando o teor de carboidratos, estas foram tratadas com uma protease (Pronase E). Para tanto as amostras (100 mg) foram dissolvidas em tampão fosfato e após período de

incubação com Pronase E, seguida de inativação térmica, foram dialisadas contra água destilada (membrana de 2 kDa), e liofilizadas, resultando nas frações EAF-Ate e EAF-Nte (32,1 e 25,5% de rendimento em relação à massa seca inicial ao tratamento, respectivamente – Tabela 8).

TABELA 8 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS NAS ESTRATÉGIAS 2 E 3 E APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
Estratégia 2											
EAF-A	13,4	59,8	30,8	3,5	1,2	19,8	6,2	1,2	31,7	5,5	30,8
EAF-Ate	32,1	8,8	65,5	4,6	1,0	4,9	5,1	0,9	25,4	0,6	57,5
Estratégia 3											
EAF-N	14,0	57,2	16,5	2,8	1,1	33,7	4,5	3,5	19,0	6,4	29,1
EAF-Nte	25,5	31,4	36,2	2,7	0,8	8,6	2,6	1,6	4,6	1,7	77,2

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; EAF-A: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 2 (extração ácida); EAF-Ate: Fração obtida após tratamento de EAF-A com Pronase E; EAF-N: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 3 (extração neutra); EAF-Nte: Fração obtida após tratamento de EAF-N com Pronase E; ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^b LOWRY *et al.* (1951); ^c DUBOIS *et al.* (1956); ^d Monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por GLC; ^e FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991); Tr: Traço ($\leq 1\%$).

O teor inicial de proteínas foi reduzido, após tratamento enzimático, de 59,8% (EAF-A) para 8,8% na fração EAF-Ate e de 57,2% (EAF-N) para 31,4% na fração EAF-Nte. Em consequência da redução na concentração de proteínas, o percentual de carboidratos dobrou, passando de 30,8 para 65,5% e 16,5 para 36,2% nas frações tratadas, EAF-Ate e EAF-Nte, respectivamente.

Comparando-se a composição monossacarídica da fração EAF-Ate com a fração EAF-A que a originou destaca-se uma redução da arabinose (4,9 mol%) e galactose (25,4 mol%) aumento de e ramnose (4,6 mol%). Alterações mais significativas ocorreram na fração EAF-Nte, devido ao grande aumento no conteúdo de ácido urônico, que passou de 29,1 para 77,2%. Os açúcares neutros tornaram-se uma pequena parte da fração, mantendo a galactose e arabinose como monossacarídeos majoritários.

O espectro de RMN de ¹³C da fração EAF-Ate (Figura 31), mostra perfil semelhante ao da fração EAF-A. Na região anomérica (110 - 90 ppm) é possível visualizar um sinal intenso em 104,4 ppm referente às unidades de β -D-Galp

(FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; LIMA, 2008). São observados também deslocamentos químicos em 77,6; 74,5; 73,5; 72,1; 60,9 ppm, correspondentes ao C-4, C-5, C-3, C-2 e C-6, respectivamente, das unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-ligadas (GORIN; MAZUREK, 1975; FRANSEN *et al.*, 2000; LIMA, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009). É interessante destacar também a existência de sinais com baixa intensidade que ressonam em 100,1 e 99,2 ppm correspondentes à unidades de α -D-GalpA (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008). O espectro de ^{13}C apresenta também em campo mais alto deslocamentos químicos em 16,9 e 20,2 ppm referentes ao $-\text{CH}_3$ das unidades de ramnose e grupamento acetil, respectivamente (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006). Os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos ressonam em 52,8 ppm (COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008).

Na fração EAF-Nte, é possível observar através do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 32) a presença de deslocamentos químicos correspondentes a ácido galacturônico. Destaca o sinal em 99,2 ppm correspondente ao C-1 de unidades não-esterificadas, e o sinal em campo muito baixo a 174,5 ppm correspondentes aos grupos carboxílicos livres (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008). Sinais alargados podem ser visualizados na região entre 80 – 60 ppm, que não foram atribuídos a nenhum monossacarídeo devido a baixa resolução dos picos. É possível ainda visualizar sinais correspondentes a proteínas na região entre 40 – 10 ppm, o que já havia sido evidenciado nas análises químicas.

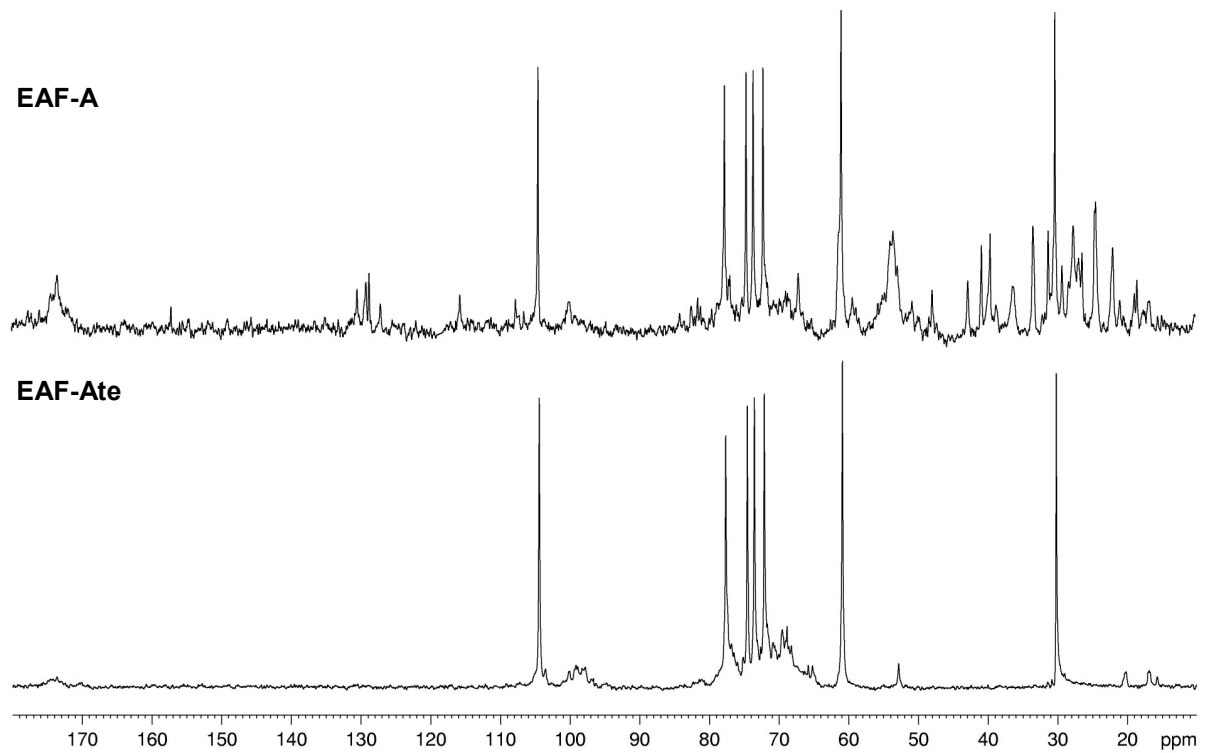


FIGURA 31 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-A E EAF-Ate
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

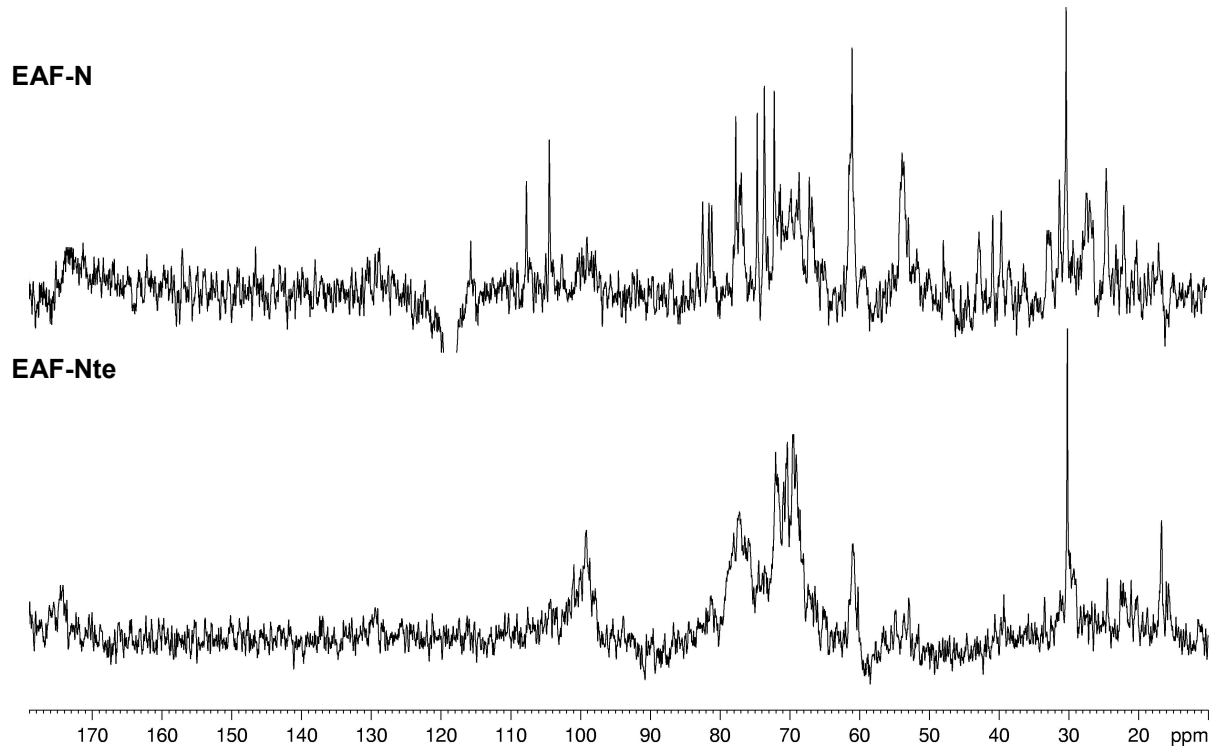


FIGURA 32 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-N E EAF-Nte
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Com bases nessas análises é possível afirmar que o tratamento enzimático foi efetivo para purificação da fração EAF-A quanto ao teor de proteína, sem causar

hidrólise ao polissacarídeo e mantendo as características originais da fração mãe. Para a fração EAF-N observou-se após o tratamento enzimático uma redução de aproximadamente 50% das proteínas. Esta disparidade entre os resultados do tratamento enzimático pode ser decorrência da diferença entre as condições de extração utilizadas para obtenção dessas frações. A estratégia 2, onde a extração é realizada em pH ácido e alta temperatura, alterou a estrutura do polissacarídeo de forma que o ataque da enzima nas unidades de proteínas foi facilitado ou as proteínas presentes já haviam sido degradadas parcialmente durante o processo de extração.

É interessante destacar ainda que o tratamento enzimático na fração EAF-N gerou uma fração EAF-Nte bastante diferente, onde o ácido galacturônico é o açúcar majoritário. É possível que isto seja decorrência da ação da enzima, de forma que ao clivar as proteínas, polissacarídeos de menor massa foram gerados e eliminados durante o processo de diálise alterando a composição monossacarídica.

6.1.2.5 Análise por HPSEC-MALLS-RID

As frações EAF-A e EAF-N e suas derivadas EAF-ATs, EAF-Ate e EAF-NTs foram submetidas a análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-RID).

Através do detector de índice de refração é possível visualizar que as frações EAF-A, EAF-ATs e EAF-Ate (Figura 33) mostraram perfis cromatográficos heterogêneos, polidispersos, indicando a presença de massas moleculares diferentes, eluindo após os 40 min. Alguns picos foram detectados apenas pelo detector de índice de refração, indicando alta concentração, porém baixa massa molecular.

Da mesma forma, as frações EAF-N e EAF-NTs (Figura 34) mostraram perfis cromatográficos heterogêneos, polidispersos, indicando a presença de massas moleculares diferentes, eluindo após os 35 min.

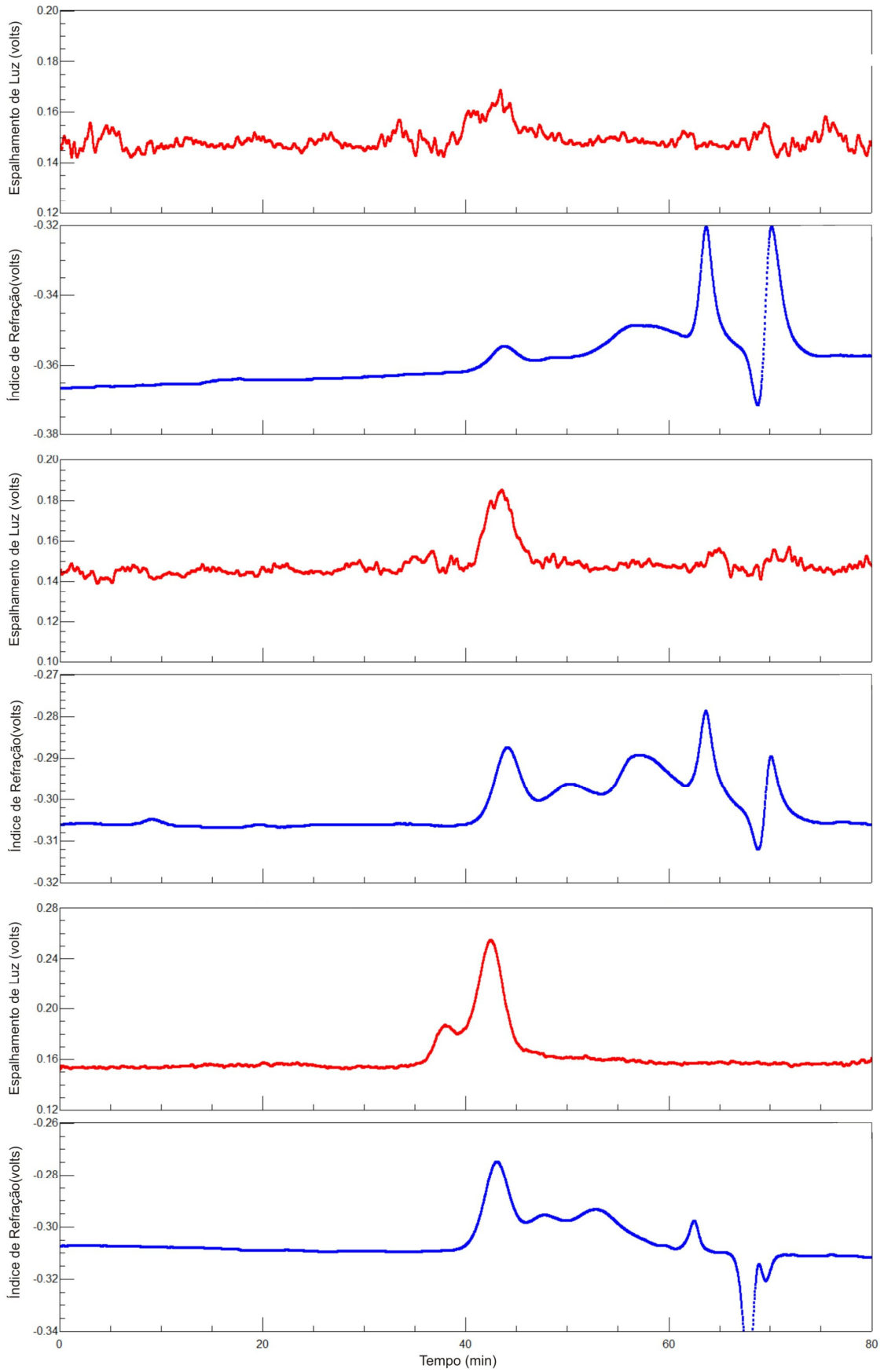


FIGURA 33 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-A; EAF-ATs E EAF-Ate

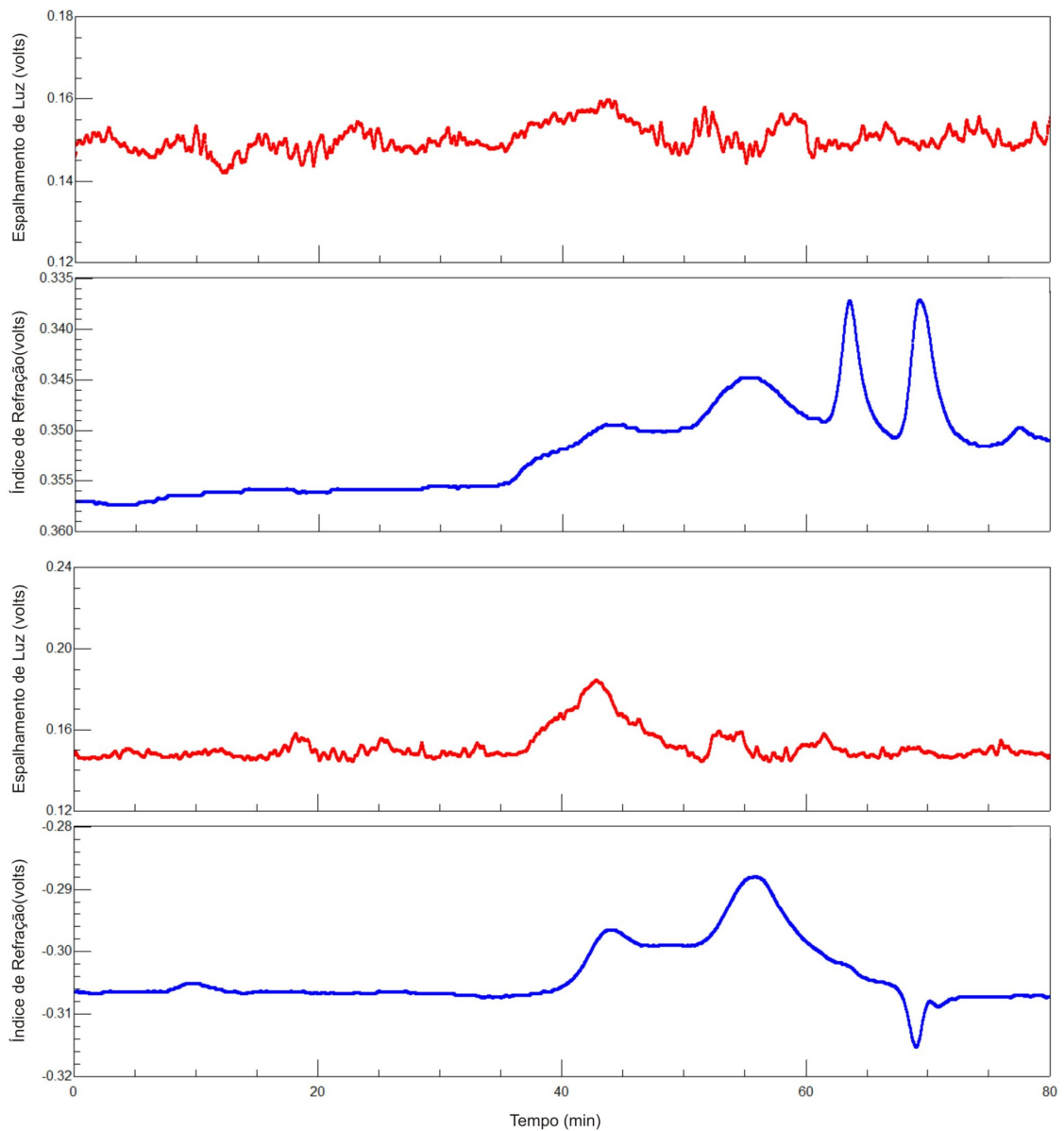


FIGURA 34 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-N E EAF-NTs

6.1.3 Estratégia 4 e 5 – Polissacarídeos Quimiotransformados

6.1.3.1 Extração e Obtenção dos Polissacarídeos

Visto que as frações obtidas a partir das estratégias 2 e 3 apresentaram alto teor de proteínas, duas novas estratégias foram traçadas (estratégias 4 e 5), na

tentativa de precipitar proteínas e ao final manter-se com moléculas de alta massa molecular. Com objetivo de melhorar o rendimento das frações as estratégias 4 e 5 sofreram dois ciclos sequenciais de extração onde os número 1 e 2 no nome das frações designam se elas foram obtidas a partir do primeiro ou segundo ciclo de extração, respectivamente.

A estratégia 4 é oriunda da estratégia 2. Nesta o farelo de soja foi pesado e diluído em água destilada numa concentração de 15 g%. O pH inicial da solução se encontrava em 6,5, após seu devido ajuste até pH 2,0 com adição de HCL 1 M a solução foi submetida a uma pressão relativa de 1 atm, 121 °C por 1 h (processo de autoclavação). Após este tratamento o material foi filtrado com auxílio de um coador de pano; o filtrado foi neutralizado com NaOH 0,5 M e centrifugado. O precipitado obtido foi reunido ao material retido anteriormente na filtração e submetidos a mais um ciclo de extração. Os sobrenadantes foram novamente submetidos ao processo de autoclavação por mais 15 min, e após redução de seus volumes foram adicionados de uma solução de TCA (80% p/v) para precipitação das proteínas. As misturas foram então homogeneizadas e centrifugadas. Os precipitados com TCA obtidos foram neutralizados, dialisados e liofilizados, originando as frações EAF-A1Tp e EAF-A2Tp (11,1 e 7,1% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja, respectivamente). Aos sobrenadantes foram adicionadas três partes de etanol para precipitação de polissacarídeos e após centrifugação os precipitados etanólicos obtidos foram neutralizados, dialisados e liofilizados, originando as frações EAF-A1Ep e EAF-A2Ep (1,9 e 0,5% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja, respectivamente). Os sobrenadantes foram neutralizados e após terem seus volumes reduzidos, foram dialisados e liofilizados, dando origem às frações EAF-A1Es e EAF-A2Es (1,5 e 0,3% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja, respectivamente).

A estratégia 5 é oriunda a partir da estratégia 3. Nesta o farelo de soja foi pesado e diluído em água destilada numa concentração de 15 g%. O pH inicial da solução se encontrava em 6,5, após seu devido ajuste até pH 7,0 com NaOH 0,5 M, a solução foi submetida a uma pressão relativa de 1 atm, 121 °C por 1 h (processo de autoclavação). Após este tratamento o material foi filtrado com auxílio de um coador de pano; o filtrado foi neutralizado com NaOH 0,5 M e centrifugado. O precipitado obtido foi reunido ao material retido anteriormente na filtração e submetidos a mais um ciclo de extração. Os sobrenadantes foram novamente

submetidos ao processo de autoclavação por mais 15 min, e após redução de seus volumes foram adicionados de uma solução de TCA (80% p/v) para precipitação das proteínas. As misturas foram então homogeneizadas e centrifugadas. Os precipitados com TCA obtidos foram neutralizados, dialisados e liofilizados, originando as frações EAF-N1Tp e EAF-N2Tp (16,4 e 17,0% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja, respectivamente). Aos sobrenadantes foram adicionadas três partes de etanol para precipitação de polissacarídeos e após centrifugação os precipitados etanólicos obtidos foram neutralizados, dialisados e liofilizados, originando as frações EAF-N1Ep e EAF-N2Ep (2,7 e 2,1% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja, respectivamente). Os sobrenadantes foram neutralizados e após terem seus volumes reduzidos, foram dialisados e liofilizados, dando origem às frações EAF-N1Es e EAF-N2Es (10,6 e 0,4% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja, respectivamente).

6.1.3.2 Análises Químicas e de Composição Monossacarídica

As frações oriundas das estratégias 4 e 5 apresentaram baixos rendimentos (Tabela 9), isso é decorrente do fato de terem sofrido uma etapa de purificação adentro ao processo de extração, obtendo-se, por fim, frações de baixo rendimento porém com alto teor de pureza. A tentativa de melhorar o rendimento nessas mesmas estratégias, submetendo o farelo de soja a dois ciclos sequenciais de extrações se mostrou pouco efetivo para a estratégia 4 - onde as frações obtidas do segundo ciclo de extração representaram um aumento médio de apenas 23% no rendimento total - e efetivo para a estratégia 5 - onde as frações apresentaram rendimentos bastante similares em ambos os ciclos de extração, representando um aumento médio de 77% no rendimento total.

TABELA 9 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS ESTRATÉGIAS 4 E 5

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
Estratégia 4											
EAF-A1Ep	1,9	4,7	93,9	6,6	1,1	8,8	10,9	1,7	22,4	4,0	44,4
EAF-A2Ep	0,5	8,2	89,2	5,6	Tr	0,9	12,2	0,9	15,3	3,4	61,6
EAF-A1Es	1,5	40,5	58,6	13,0	Tr	1,0	8,8	1,4	8,8	2,6	64,4
EAF-A2Es	0,3	37,5	50,2	13,9	Tr	2,2	10,1	2,3	9,5	6,4	55,5
Estratégia 5											
EAF-N1Ep	2,7	3,9	79,0	5,9	2,1	21,2	8,7	2,5	27,3	2,4	30,2
EAF-N2Ep	2,0	3,4	73,7	4,3	2,2	29,8	5,2	Tr	30,9	Tr	27,7
EAF-N1Es	0,5	46,5	36,1	13,6	5,3	7,9	7,5	10,0	13,9	16,4	25,5
EAF-N2Es	0,4	43,4	33,9	12,4	3,9	4,5	14,5	10,9	16,1	14,0	23,7

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; EAF-A1Ep, EAF-A2Ep: Frações polissacarídicas obtidas a partir da Estratégia 4 (extração ácida seguida de precipitação com TCA e etanol); EAF-A1Es, EAF-A2Es: Frações etanólicas obtidas a partir da Estratégia 4; EAF-N1Ep, EAF-N2Ep: Frações polissacarídicas obtidas a partir da Estratégia 5 (extração neutra seguida de precipitação com TCA e etanol); EAF-N1Es, EAF-N2Es: Frações etanólicas obtidas a partir da Estratégia 5; ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^b LOWRY *et al.* (1951); ^c DUBOIS *et al.* (1956); ^d Monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por GLC; ^e FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991); Tr: Traço ($\leq 1\%$).

As frações obtidas a partir das estratégias 4 e 5 apresentaram alto teor de carboidratos, entre 33,9 – 93,9%. O elevado teor de carboidratos é decorrente do tratamento com TCA que estas frações sofreram. As proteínas foram precipitadas concentrando os carboidratos. Nota-se que as frações correspondentes aos precipitados etanólicos apresentam teores superiores aos sobrenadantes etanólicos. Os teores de proteínas variaram entre 3,4 e 46,5%, onde as frações correspondentes aos precipitados etanólicos apresentam teores inferiores aos sobrenadantes etanólicos. Não houve diferença nos teores de carboidratos e proteínas entre os ciclos de extrações das frações correspondentes.

As frações EAF-A1Ep, EAF-N1Ep e EAF-N2Ep apresentam como principais constituintes a arabinose e a galactose. Todas as frações obtidas a partir das estratégias 4 e 5 apresentaram alto teor de xilose e galactose. As frações EAF-A1Es, EAF-A2Es, EAF-N1Es, EAF-N2Es apresentaram teores consideráveis de ramnose.

É possível observar em todas as frações um alto teor de ácidos urônicos, representando totais entre 23,7 – 64,4% dos carboidratos. Estes resultados aliado

aos dados de composição monossacarídica, sugerem presença de pectina em todas as frações obtidas da estratégia 4.

As frações precipitadas com TCA (EAF-A1Tp; EAF-A2Tp; EAF-N1Tp e EAF-N2Tp) oriundas das estratégias 4 e 5 apresentaram altos rendimentos, porém por possuírem alto teor de proteínas (66,3 – 90,6%) e baixo teor de carboidratos (2,1 – 7,5%) não são frações de interesse, estando demonstradas na Tabela 10 apenas para comprovar a eficiência do tratamento com TCA + etanol para precipitação de proteínas.

TABELA 10 - ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS ESTRATÉGIAS 4 E 5

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c
Estratégia 4			
EAF-A1Tp	11,2	84,7	4,4
EAF-A2Tp	7,13	90,6	2,1
Estratégia 5			
EAF-N1Tp	16,6	68,1	7,5
EAF-N2Tp	17,0	66,3	4,0

PTN: Proteínas; EAF-A1Tp, EAF-A2Tp: Frações insolúveis obtidas após tratamento com TCA na Estratégia 4; EAF-N1Tp, EAF-N2Tp: Frações insolúveis obtidas após tratamento com TCA na Estratégia 5; ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^b LOWRY *et al.* (1951); ^c DUBOIS *et al.* (1956).

6.1.3.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear

Comparando-se os espectros de RMN ¹³C das frações EAF-A, EAF-A1 e EAF-A2 (Figura 35), pode-se observar diferenças entre os produtos obtidos das diferentes estratégias de extração. A partir da fração EAF-A (Estratégia 2), foi obtido um polissacarídeo composto principalmente por unidades de β-D-Galp (1→4)-ligadas, uma galactana, como já foi discutido anteriormente (6.1.2.3).

As frações EAF-A1Ep e EAF-A2Ep apresentam espectros de RMN ¹³C semelhantes entre elas, mas com uma importante diferença em relação à fração EAF-A. Embora apresentem os deslocamentos químicos correspondentes a unidades de β-D-Galp (1→4)-ligadas (104,4; 77,6; 74,5; 73,5; 72,1; 60,9 ppm correspondentes ao C-1, C-4, C-5, C-3, C-2 e C-6, respectivamente) também é possível observar sinais intensos correspondentes as unidades de ácido

galacturônico, sinais estes praticamente não detectáveis no espectro da fração EAF-A. Deslocamentos químicos em 100,0 e 99,1 ppm, são respectivos ao C-1 de unidade de α -D-GalpA esterificadas e não esterificadas no C-6 (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008) e em 98,4 ppm correspondem ao C-1 das unidades de α -L-Rhap (CIPRIANI *et al.*, 2004; RENARD *et al.*, 1998). Destacam-se também os sinais em 174,0 e 170,7 ppm referentes aos grupos carboxílicos livres e metil-esterificados do ácido galacturônico (C-6), respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1999; CIPRIANI *et al.*, 2004; COZZOLINO *et al.*, 2006).

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta ainda, em campo mais alto, deslocamentos químicos em 16,8 e 20,2 ppm referentes ao $-\text{CH}_3$ das unidades de ramnose (C-6) e grupamento acetil, respectivamente (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006). Os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos ressonam em 52,8 ppm (COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008).

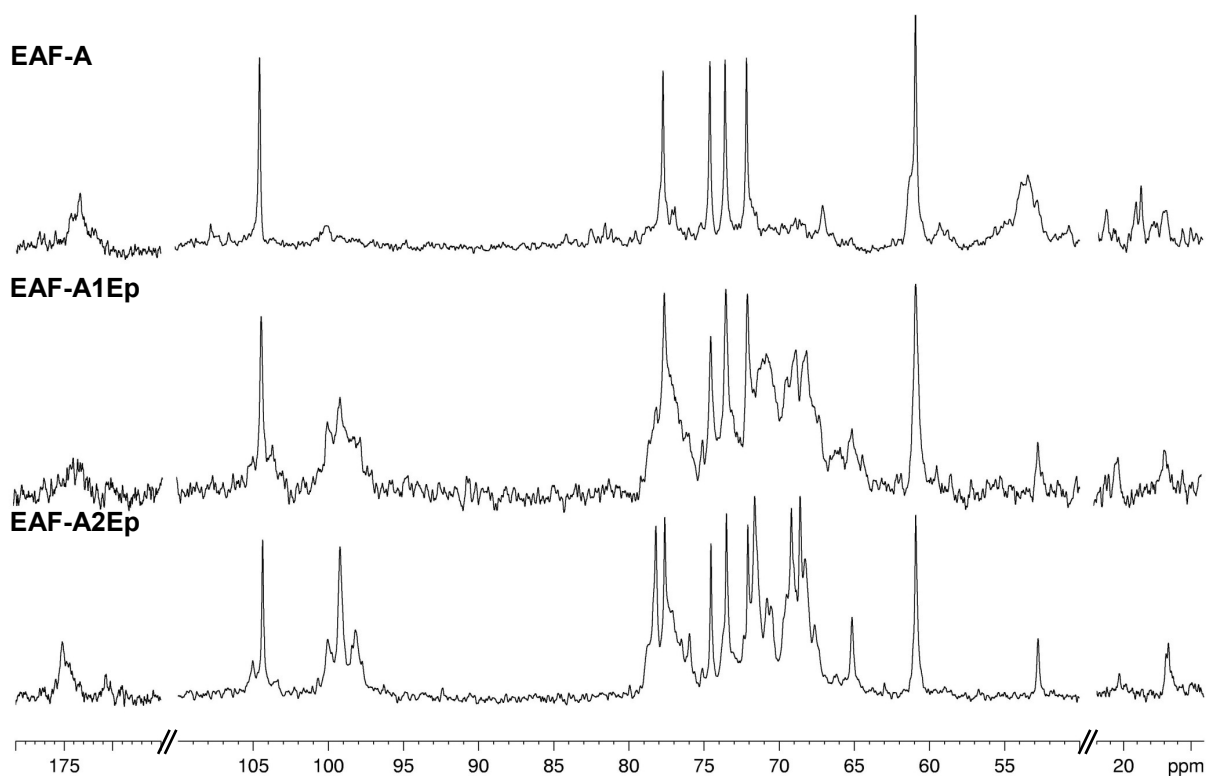


FIGURA 35 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-A, EAF-A1Ep e EAF-A2Ep
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Da mesma forma, as frações EAF-A1Es e EAF-A2Es também foram comparadas através de seus espectros de RMN ^{13}C (Figura 36). É possível

visualizar sinais característicos de proteínas, 10-55, 120-130, 170-180 ppm, correspondentes a cadeias laterais e ligações peptídicas, dupla ligação e grupos carboxílicos, respectivamente (ZERI *et al.*, 1996), uma vez que estas frações possuem alto percentual de proteínas (37,5 e 40,5% - Tabela 9).

Na região anomérica (110 – 90 ppm) destacam-se sinais em 100,1 e 99,3, respectivos ao C-1 esterificado e não esterificado das unidades de α -D-GalpA (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008). Nesta mesma região é possível visualizar um sinal em 103,5 ppm, respectivo ao C-1 das unidades de β -D-Xylp (SIMAS *et al.*, 2004; USOV; BILAN; SHASHKOV, 2007) e em 98,4 ppm do C-1 das unidades de α -L-Rhap (CIPRIANI *et al.*, 2004; RENARD *et al.*, 1998). Estes dados juntamente com os dados de composição monossacarídica corroboram a existência de pectina nestas frações.

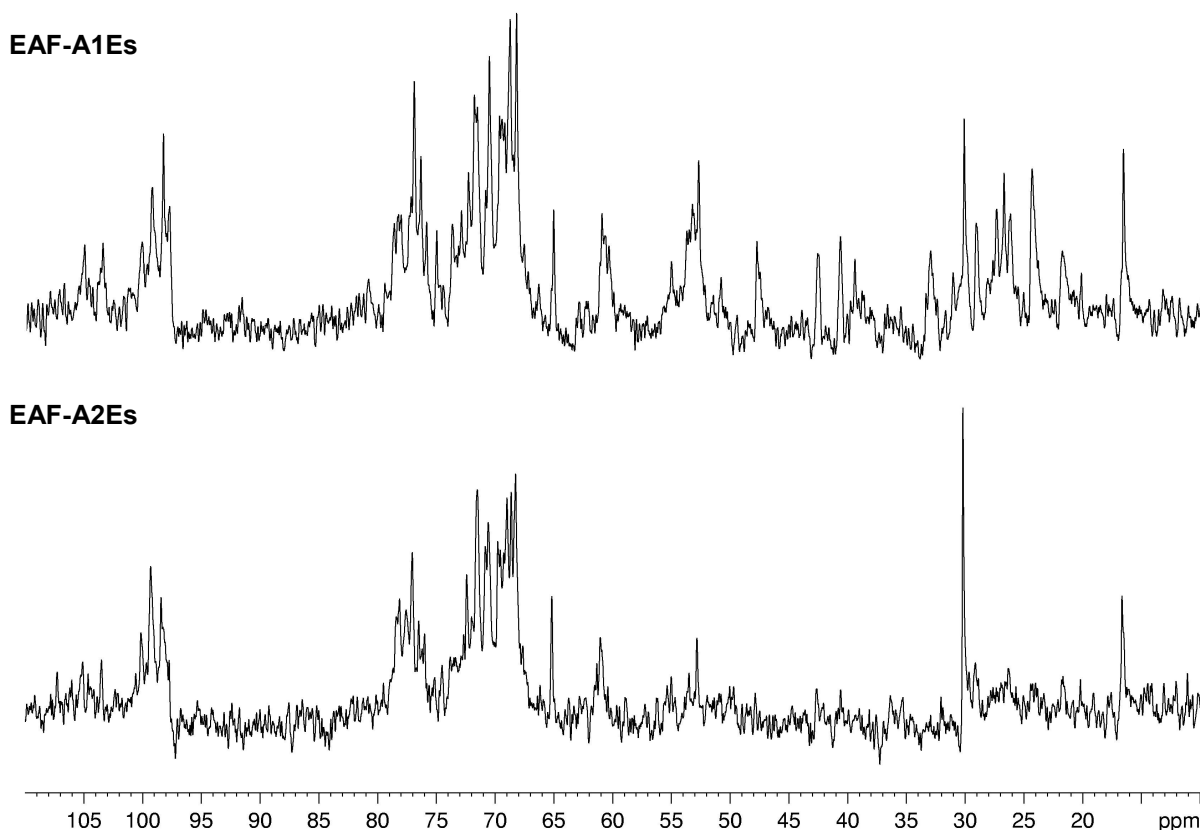


FIGURA 36 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-A1Es e EAF-A2Es
Solvente: D_2O (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Da mesma forma, as frações EAF-N, EAF-N1 e EAF-N2 foram comparadas através de seus espectros de RMN ^{13}C (Figura 37). É observada uma grande similaridade entre os sinais. Novamente é possível visualizar deslocamentos

químicos correspondentes a β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-ligadas (104,4; 77,6; 74,5; 73,5; 72,1; 60,9 ppm correspondentes ao C-4, C-5, C-3, C-2 e C-6, respectivamente). Destaca-se sinal pouco intenso em 99,1 ppm, respectivo ao C-1 não esterificado das unidades de α -D-GalpA (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008).

Os sinais em 107,6; 107,1 e 106,5 ppm podem ser atribuídos ao C-1 das unidades de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1999; SIMS; FURNEAUX, 2003). Na região de carbono substituído, os sinais em 85,1; 84,1; 82,3; 81,5 e 81,1 ppm podem ser atribuídos a C-2, C-3 ou C-4, das unidades de α -L-Araf e em 67,0 ppm ao C-5 substituído das unidades de α -L-Araf (1 \rightarrow 5) ligadas (FRANSEN *et al.*, 2000; SIMAS, 2008; CAPEK *et al.*, 2010).

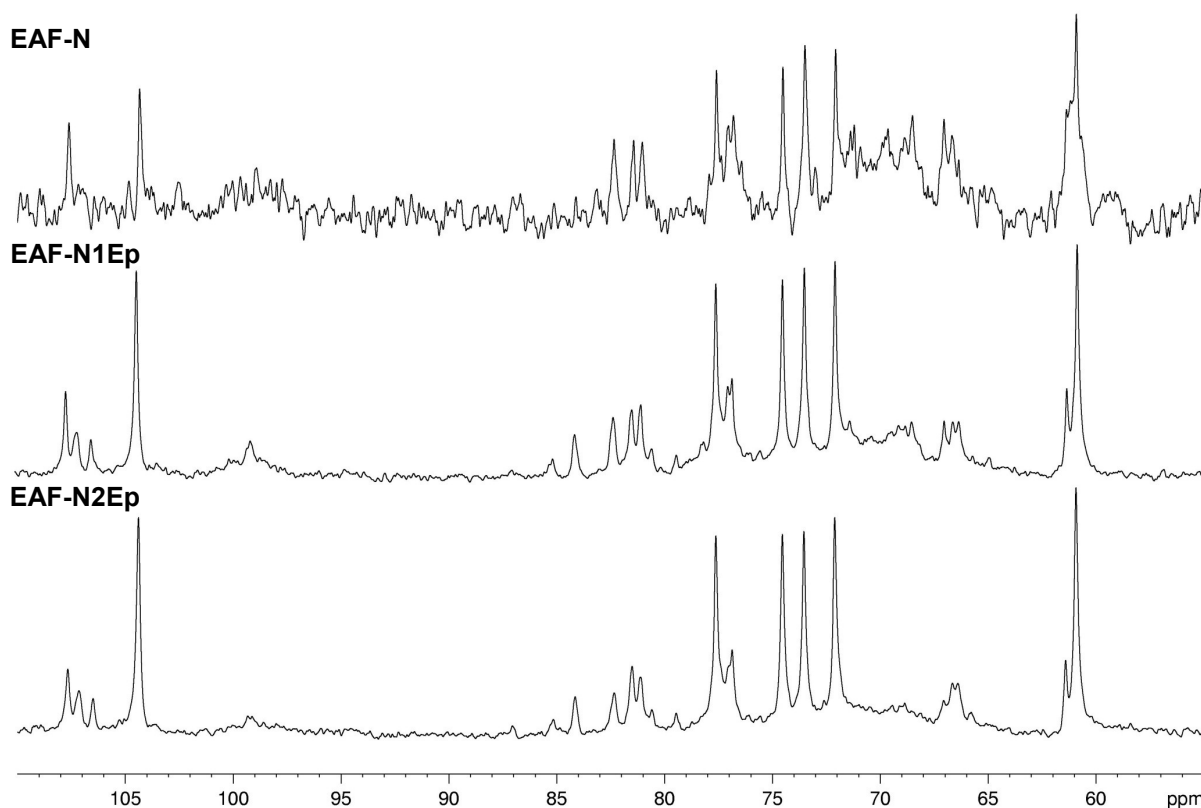


FIGURA 37 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-N, EAF-N1Ep e EAF-N2Ep
Solvente: D_2O (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Comparando-se os espectros de RMN de ^{13}C entre EAF-N1Es e EAF-N2Es (Figura 38), frações estas obtidas a partir do sobrenadante etanólico, é possível visualizar, novamente, sinais característicos de proteínas, assim como os

observados nos espectros anteriores, bem como sinais característicos de presença de carboidratos.

Os espectros têm baixa resolução devido a alta insolubilidade das amostras e apresentam picos alargados e sobrepostos, o que dificulta o assinalamento dos deslocamentos químicos. Ainda assim, é possível fazer algumas observações em relação aos espectros: nota-se na região anomérica sinais em 100,0; 99,1 e 98,1 ppm, respectivos ao C-1 das unidades de α -D-GalpA (esterificado e não esterificado) e α -L-Rhap (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2004; RENARD *et al.*, 1998).

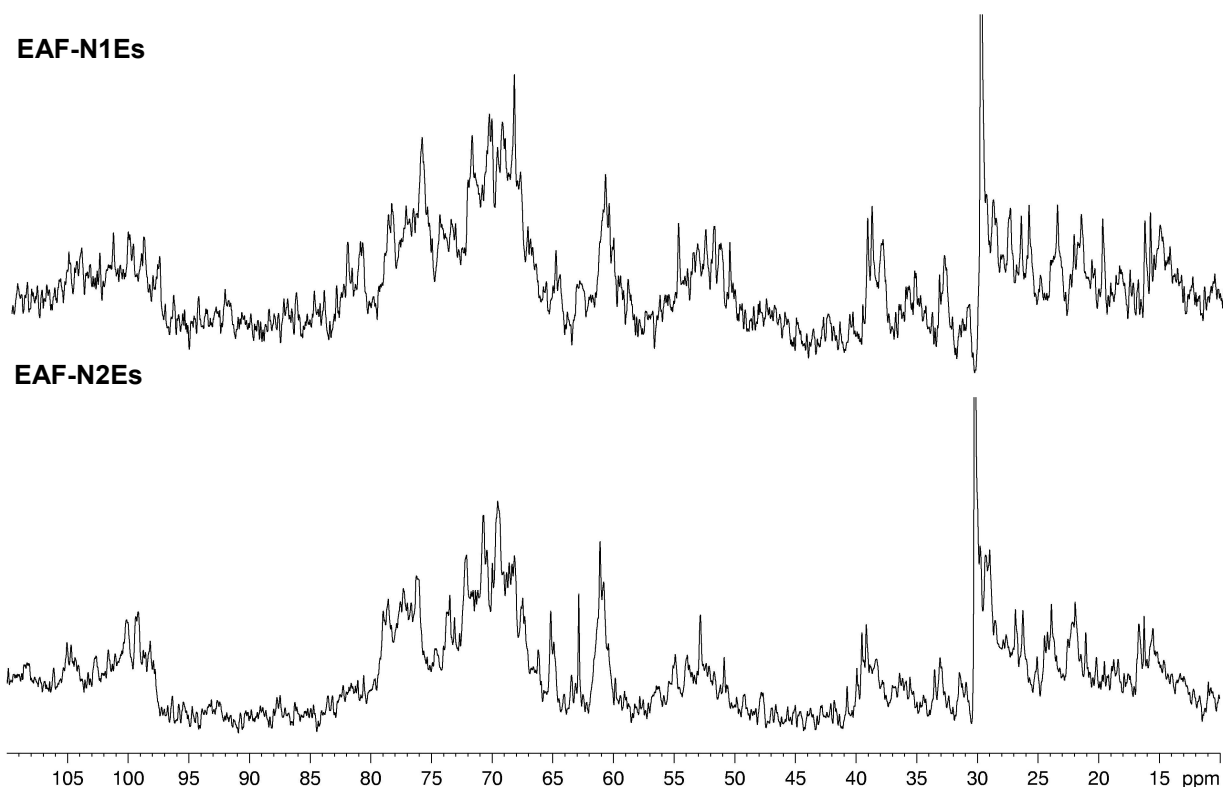


FIGURA 38 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-N1Es e EAF-N2Es
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

6.1.3.4 Análise por HPSEC-MALLS-RID

As frações EAF-A1Ep, EAF-A2Ep, EAF-N1Ep e EAF-N2Ep foram submetidas à análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica,

acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-RID).

É possível visualizar que a fração EAF-A1Ep (Figura 39) mostrou perfil cromatográfico heterogêneo, polidisperso, indicando a presença de massas moleculares diferentes, eluindo após os 40 min. O pico centrado em ≈ 45 min foi detectado pelos detectores de índice de refração e espalhamento de luz indicando que é constituído por moléculas de alta massa molar. Picos detectados pelo detector de índice de refração eluindo em 58 e 62 min não foram detectados pelo detector de espalhamento de luz, indicando alta concentração, porém baixa massa molecular.

Na Figura 40 é possível visualizar que a fração EAF-A2Ep também mostrou um perfil cromatográfico heterogêneo, polidisperso, indicando a presença de massas moleculares diferentes, O detector de espalhamento de luz não detectou nenhum desses picos, indicando a presença de moléculas de baixa massa molar. Observe-se a presença dos mesmos picos, detectados pelo RID, presentes na fração EAF-A1Ep, eluindo após os 40 min, porém com intensidades diferentes.

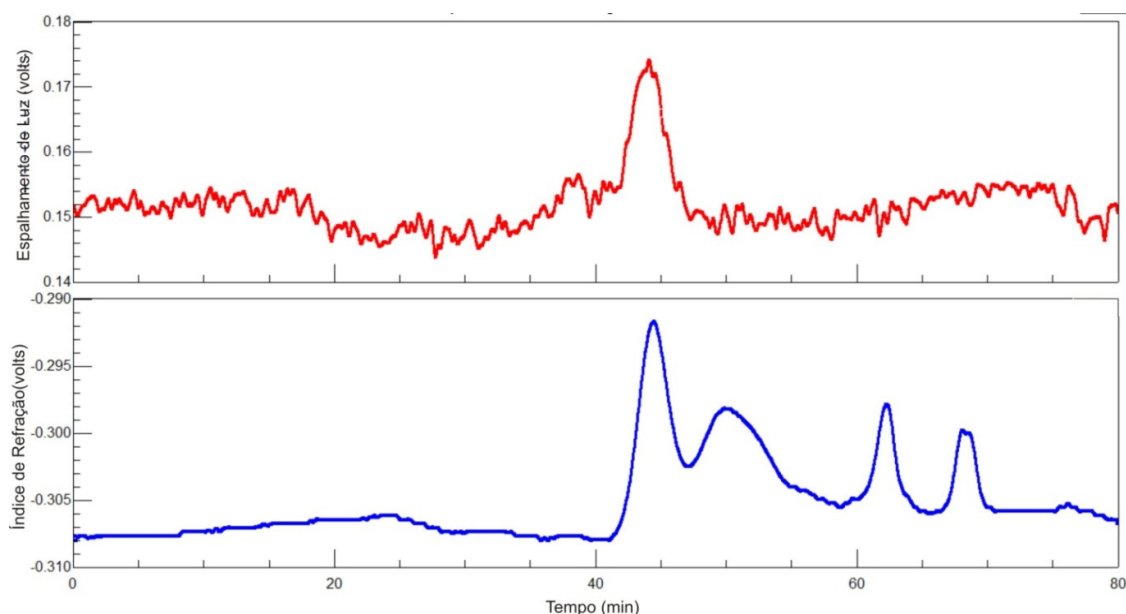


FIGURA 39 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-A1Ep

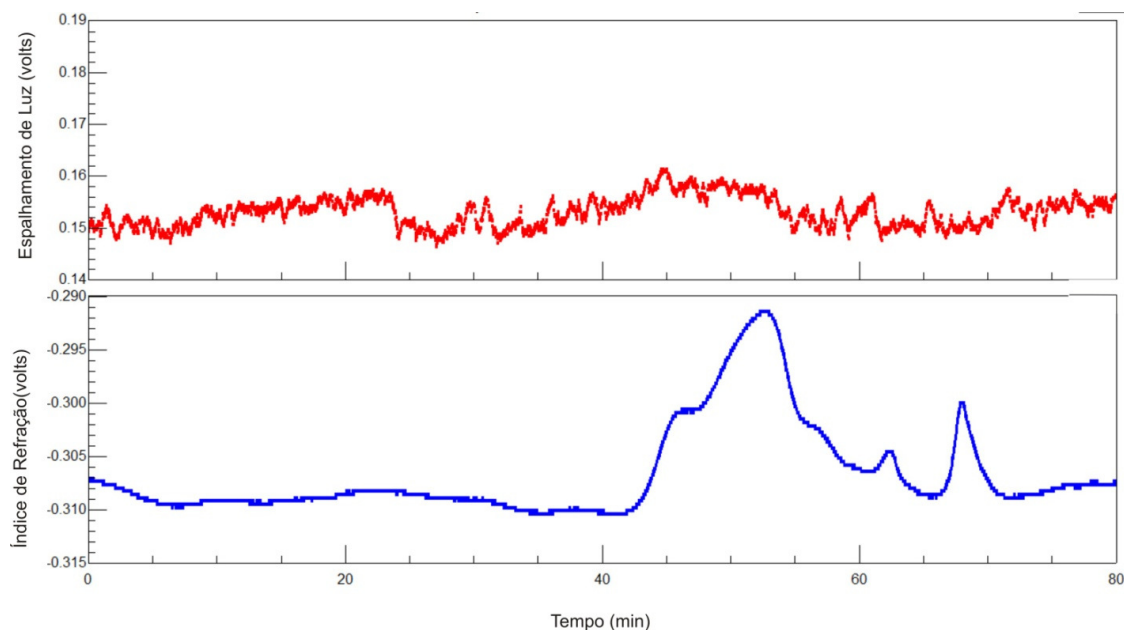


FIGURA 40 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-A2Ep

É possível visualizar que a fração EAF-N1Ep (Figura 41) mostrou perfil cromatográfico heterogêneo. O pico centrado em ≈ 43 min foi detectado pelos detectores de índice de refração e espalhamento de luz indicando que é constituído por moléculas de alta massa molar. É interessante destacar que este pico, detectado pelo espalhamento de luz, apresenta um ombro a esquerda, indicando a presença de compostos de alta massa e baixa concentração. O pico invertido, detectado pelo detector de índice de refração, após os 65 min indica presença de água na amostra.

Analisando a Figura 42 verifica-se que a fração EAF-N2Ep foi eluída com um pico simétrico, indicando assim que a mesma encontra-se homogênea quanto a sua massa. O valor de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com relação a concentração) calculado em 0,128 foi utilizado para a determinação da massa molecular ponderal média (M_w) da fração EAF-N2Ep, que foi de 936,6 kDa.

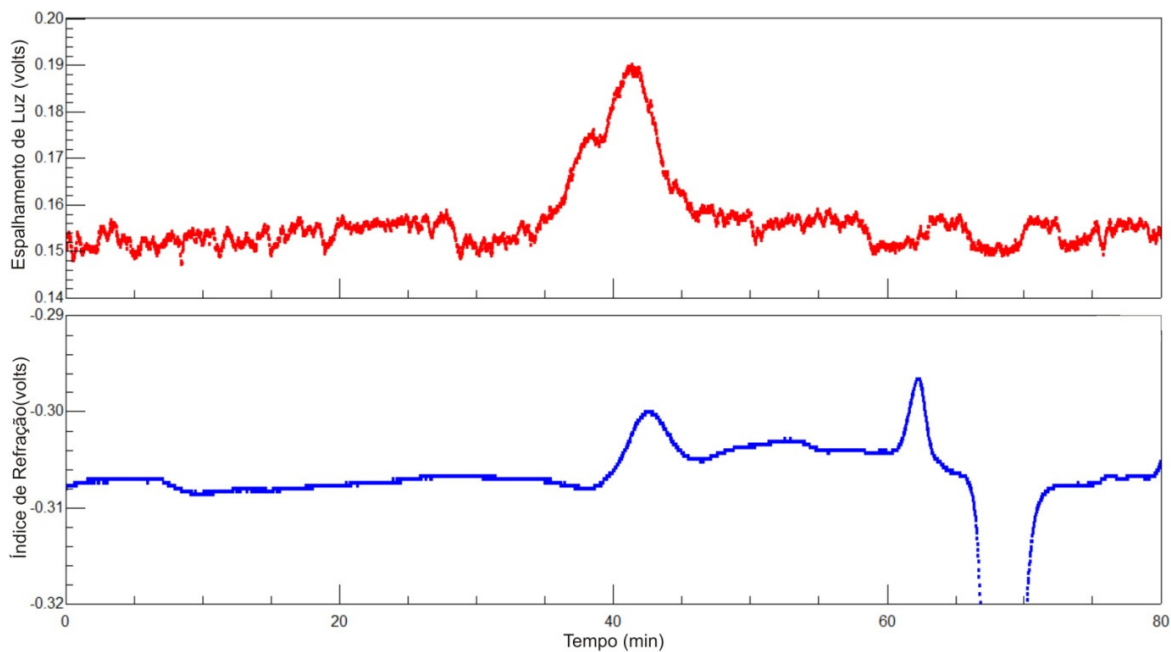


FIGURA 41 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-N1Ep

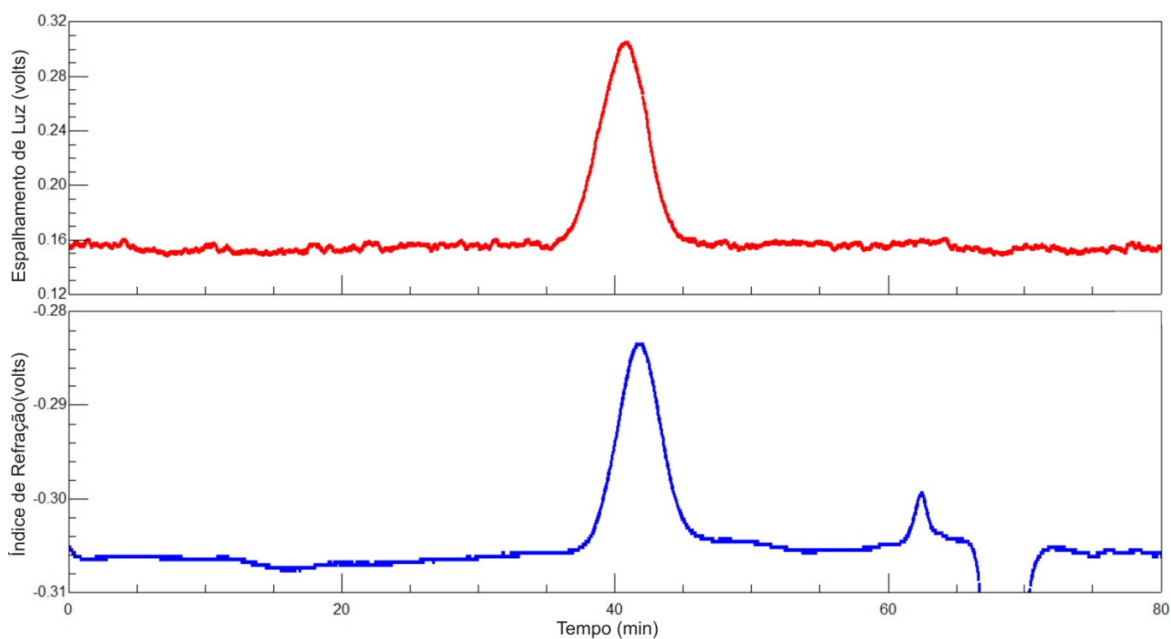


FIGURA 42 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-N2Ep

6.1.3.5 Purificação e fracionamento da fração EAF-A1Ep

6.1.3.5.1 Tratamento com CaCl_2

Com o objetivo de determinar se os ácidos urônicos e os açúcares neutros (Rha, Ara, Xyl e Gal, Tabela 9) formavam parte da mesma estrutura polissacarídica, a fração EAF-A1Ep foi submetida a tratamento com CaCl_2 . Para tanto a amostra foi solubilizada em água destilada e adicionada de uma solução de CaCl_2 . Após agitação esta foi centrifugada, dialisada e liofilizada gerando as frações EAF-A1Cs (83,3% de rendimento em relação à massa seca inicial ao tratamento) e EAF-A1Cp (16,7% de rendimento em relação à massa seca inicial ao tratamento), correspondentes ao sobrenadante e precipitado, respectivamente.

Sabe-se que, nas pectinas de baixo grau de esterificação (abaixo de 50%), a geleificação é provocada pela formação de ligações entre íons carboxílicos e íons de cálcio, ou outro metal bi ou trivalente, os quais atuam como pontes entre pares de grupos carboxílicos de diferentes cadeias de pectinas, formando zonas de junção (Figura 43). Um excesso de íons cálcio pode induzir a formação dessas zonas com respectiva precipitação de pectato de cálcio (RINAUDO, 1996; THAKUR *et al.*, 1997, NIELSEN, 2010).

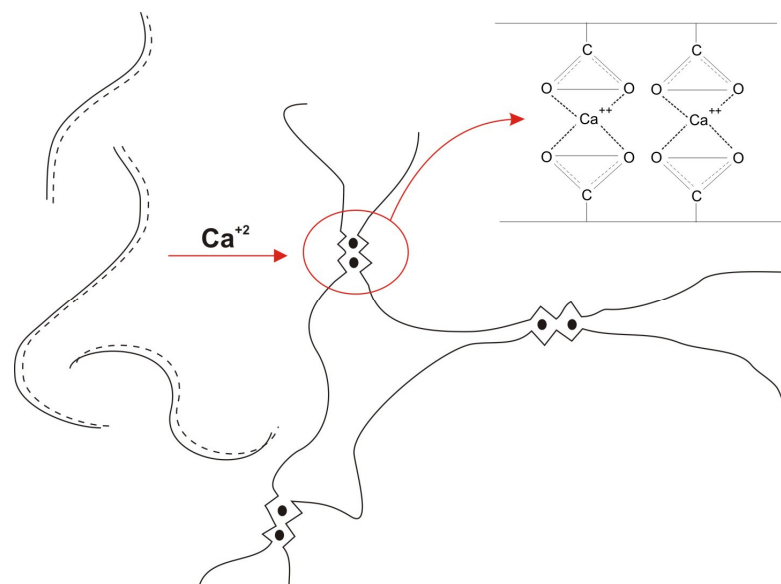


FIGURA 43 - MECANISMOS DE LIGAÇÃO CRUZADA DE MOLÉCULAS DE PECTINAS DE BAIXA ESTERIFICAÇÃO NA PRESENÇA DE CÁLCIO
 FONTE: ADAPTADO DE RINAUDO (1996)

Baseado neste conceito, esperava-se que a pectina sob forma de pectato de cálcio precipitasse e, caso um ou mais dos açúcares neutros presentes não formassem parte da pectina, estes permaneceriam em solução.

A fração EAF-A1Cs foi submetida à análise de RMN (Figura 44) e comparada a sua fração mãe, EAF-A1Ep. Destaca-se a redução do sinal em 104,3 ppm referente às unidades de β -D-Galp (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; LIMA, 2008). Há sinais intensos em 100,0 e 99,0 ppm e um sinal menos definido em 98,3 ppm, respectivos ao C-1 das unidades de α -D-GalpA esterificada e não esterificada e C-1 das unidades de α -L-Rhap (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2004; RENARD *et al.*, 1998). Destacam-se ainda deslocamentos químicos em 103,4 e 65,1 ppm respectivos ao C-1 e C-5 das unidades de β -D-Xylp (SIMAS *et al.*, 2004; USOV; BILAN; SHASHKOV, 2007).

Em campo mais baixo os sinais em 174,9 e 170,6 ppm referem-se aos grupos carboxílicos (C-6) livres e metil-esterificados do ácido galacturônico, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1999; CIPRIANI *et al.*, 2004; COZZOLINO *et al.*, 2006). Os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos ressonaram em 52,8 ppm (COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008). Em campo mais alto, é possível verificar ainda deslocamentos químicos em 16,6 e 20,2 ppm referentes ao $-\text{CH}_3$ das unidades de ramnose e grupamento acetil, respectivamente (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006).

A fração EAF-A1Cp, fração de menor rendimento, não foi analisada por RMN, devido a alta insolubilidade em água deuterada, NaOHd e DMSOd, no entanto deduz-se que os açúcares neutros estejam presentes nesta fração.

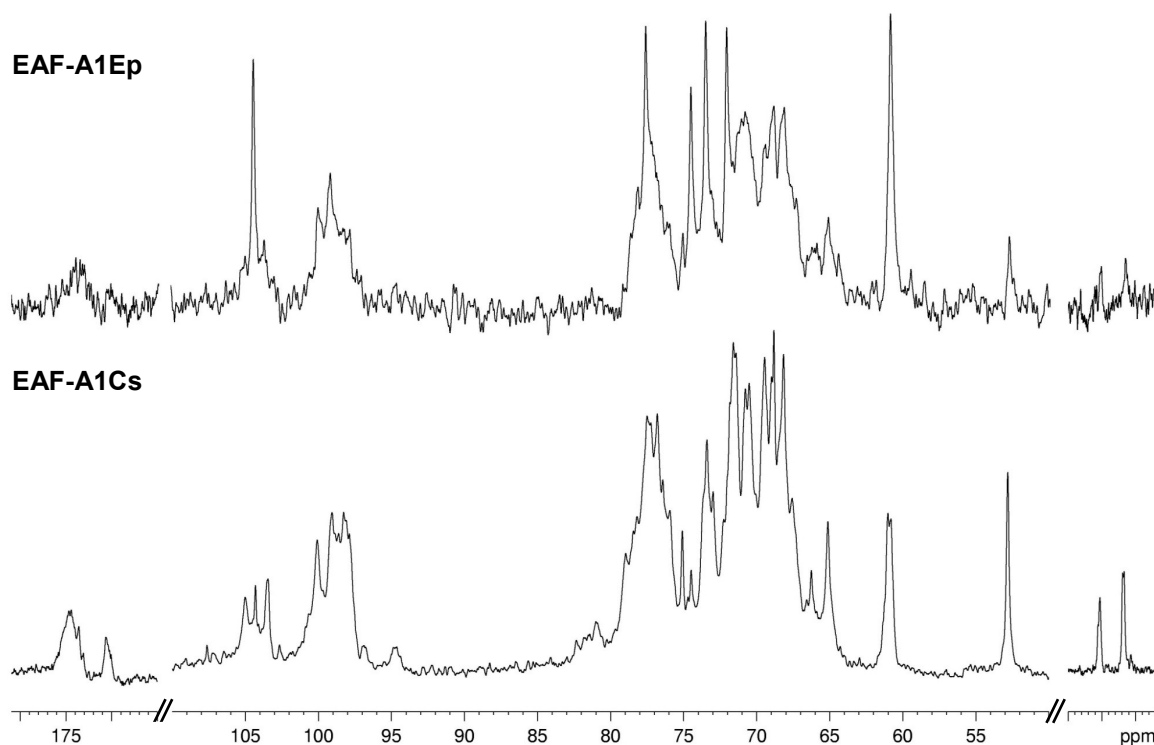


FIGURA 44 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-A1Ep e EAF-A1Cs
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

6.1.3.5.2 Fracionamento por Cromatografia de Troca Aniônica

Numa nova tentativa para verificar se os açúcares ácidos e neutros, estavam presentes na mesma estrutura ou em polissacarídeos diferentes, a fração heterogênea EAF-A1Ep (45 mg) foi submetida a cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephacel (Cl⁻). A amostra foi eluída com água destilada e soluções de cloreto de sódio em concentrações crescentes, sendo as eluições monitoradas pelo teste do fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

As amostras recuperadas do fracionamento por troca aniônica, após diálise em água destilada foram liofilizadas e nominadas: EAF-A1-w (eluída com água) e EAF-A1-0,5, EAF-A1-1,0 e EAF-A1-1,5 (eluídas com soluções de NaCl 0,5; 1,0 e 1,5 M respectivamente) (Figura 45).

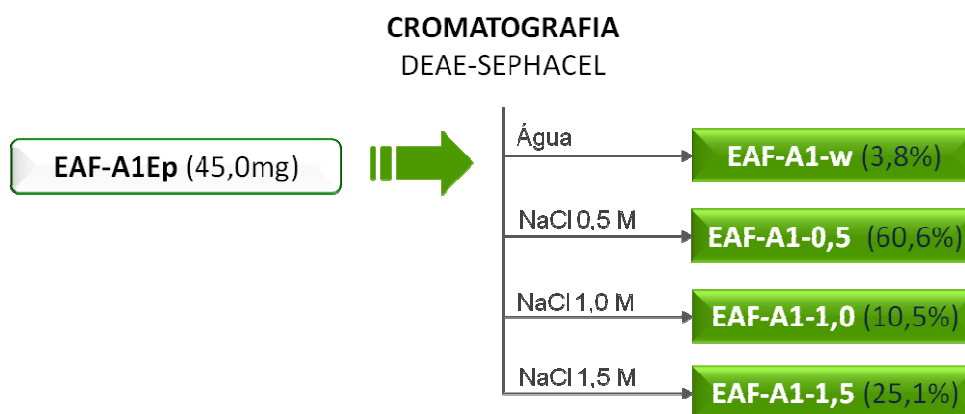


FIGURA 45 - FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO EAF-A1Ep POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA

A análise de RMN de ^{13}C foi realizada com a fração de maior rendimento EAF-A1-0,5 (Figura 46). Através deste espectro é possível afirmar que a cromatografia de troca aniônica não foi eficiente para separação desta fração, uma vez que existe alta semelhança entre os espectros da fração mãe EAF-A1Ep e sua derivada EAF-A1-0,5. Este resultado sugere que os açúcares neutros e ácidos estão ligados numa mesma molécula ou num mesmo polissacarídeo do tipo pectina, o que justifica a eluição conjunta dos mesmos.

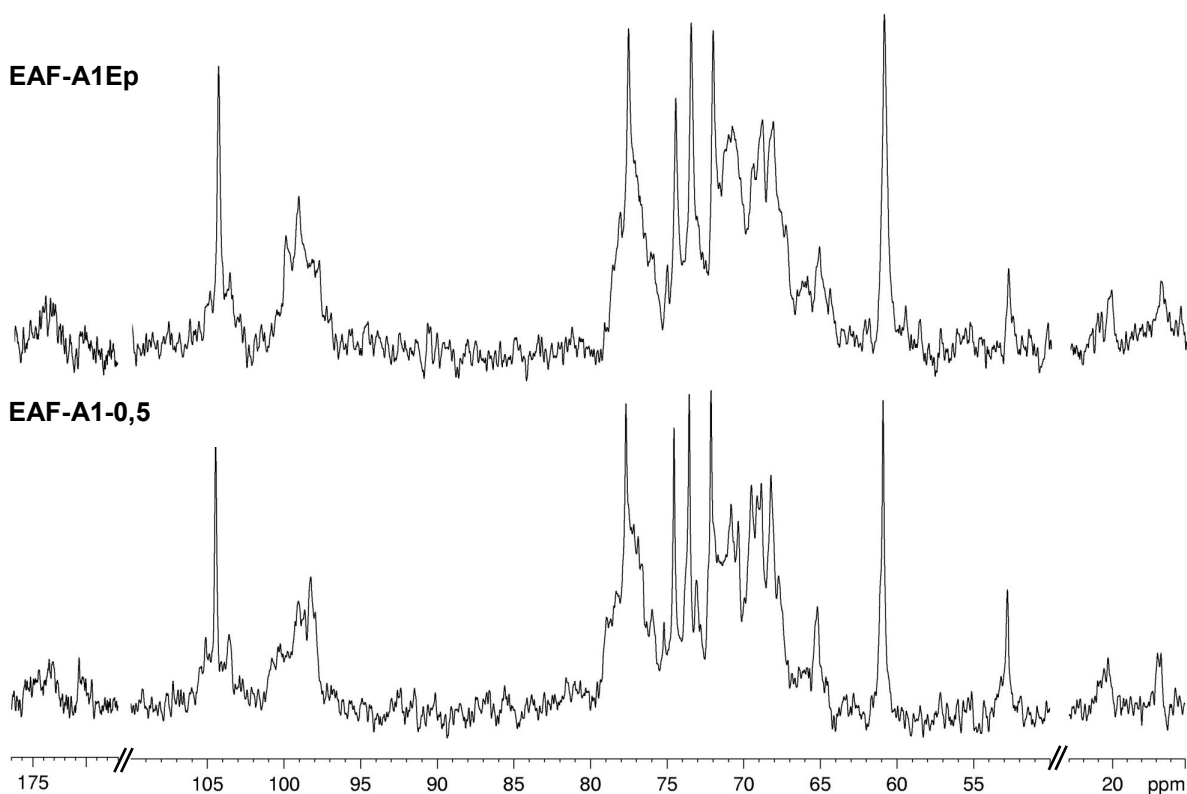


FIGURA 46 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-A1Ep e EAF-A1-0,5
Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

6.1.3.5.3 Fracionamento por Cromatografia de Exclusão

A partir da hipótese de que os açúcares neutros e ácidos estão ligados, a fração EAF-A1Ep (99,4 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão em Sepharose 6B (faixa de fracionamento de 1×10^4 a 4×10^6 Da) tendo como eluente água destilada.

A Figura 47 apresenta o perfil cromatográfico obtido após fracionamento de EAF-A1Ep em Sepharose 6B, o qual tem início de eluição no volume morto do gel, sendo assim o ideal seria submeter esta fração a uma nova cromatografia em Sepharose 4B (limite de exclusão de 2×10^7 Da). Porém como o objetivo principal do experimento foi verificar se a cromatografia de exclusão seria eficiente para determinar se os açúcares ácidos e os neutros formavam parte do mesmo polissacarídeo, decidiu-se analisar essas frações por RMN e HPSEC-MALLS-RID, a fim de verificar se este objetivo tinha sido atingido.

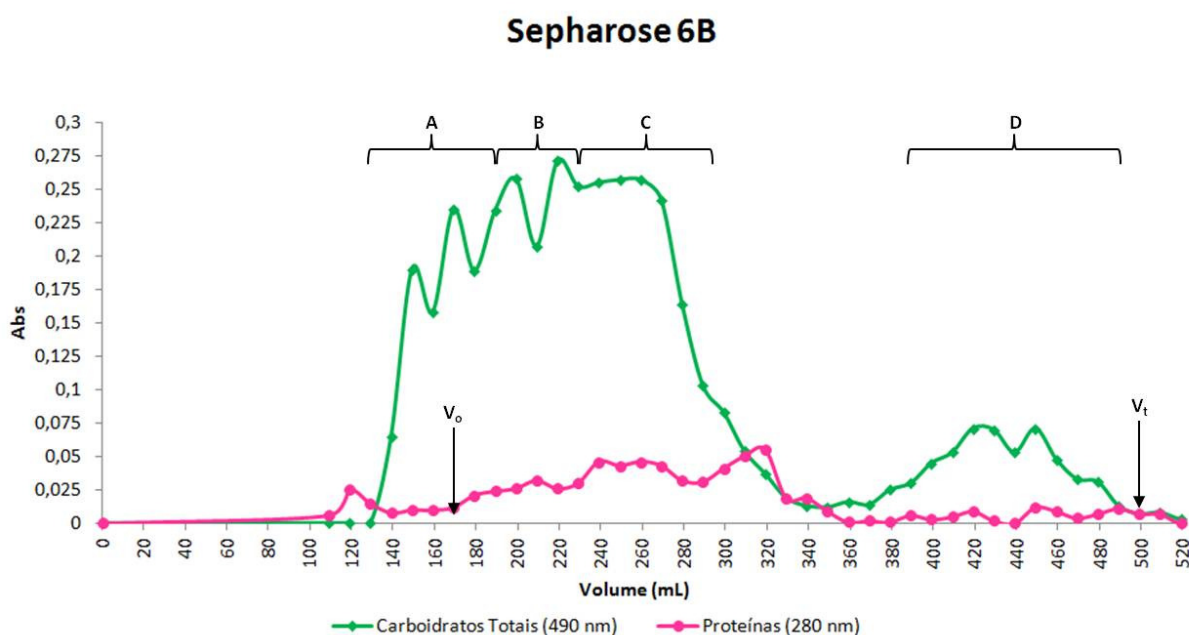


FIGURA 47 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE EAF-A1Ep EM SEPHAROSE 6B

Observa-se através do perfil cromatográfico que a fração EAF-A1Ep era constituída por carboidratos de vários tamanhos. O perfil cromatográfico permitiu a formação de quatro novas frações, conforme indicado na Figura 45 (EAF-A1EpA: 18,2%; EAF-A1EpB: 30,6%; EAF-A1EpC: 34,9%; EAF-A1EpD: 9,5%). O restante das frações foi reunido apenas para verificar o percentual de recuperação da fração nesta coluna (75,3% de recuperação total).

É interessante observar que as subfrações EAF-A1EpA, EAF-A1EpB e EAF-A1EpC formaram, no perfil de eluição da cromatografia de exclusão, um pico bastante alargado, sugerindo a presença de um mesmo polissacarídeo com massas diferentes. Análises de RMN de ^{13}C dessas frações (Figura 48) comprovam esta hipótese, devido a elevada semelhança entre os espectros. É possível observar também alta semelhança entre o espectro da fração mãe EAF-A1Ep e suas derivadas EAF-A1EpA, EAF-A1EpB e EAF-A1EpC demonstrando que este polissacarídeo é o componente majoritário da fração EAF-A1Ep.

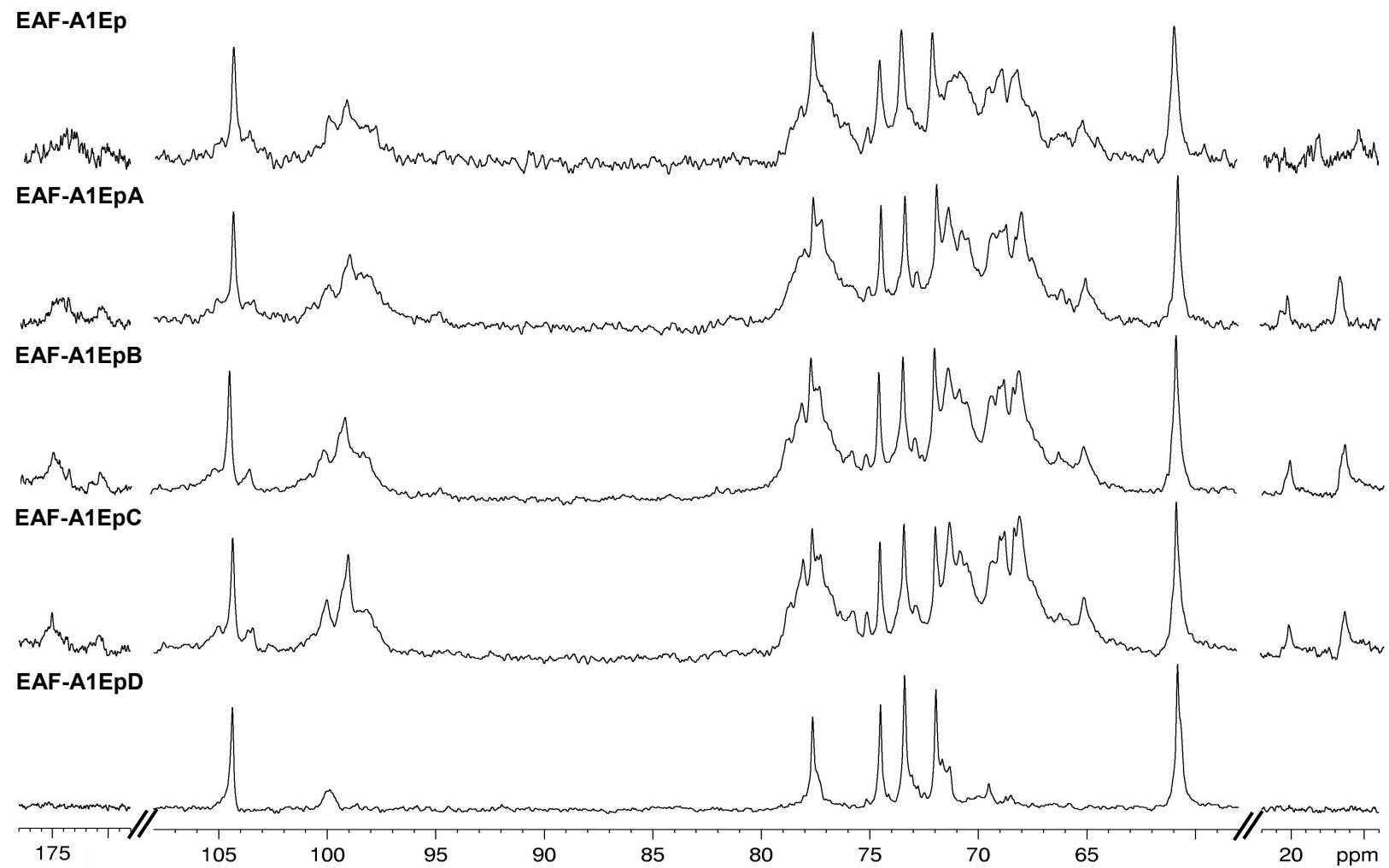


FIGURA 48 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES EAF-A1Ep, EAF-A1EpA-D
Solvente: D_2O (70 °C e 50 °C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Observam-se deslocamentos químicos em 104,3; 77,6; 74,5; 73,4; 60,8 ppm atribuídos a β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-ligadas correspondentes ao C-4, C-5, C-3 e C-6, respectivamente. Há sinais intensos em 100,0 e 99,0 ppm e um sinal menos definido em 98,2 ppm, respectivos ao C-1 das unidades de α -D-GalpA esterificadas e não esterificadas e C-1 das unidades de α -L-Rhap (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2004; RENARD *et al.*, 1998). Destacam-se ainda deslocamentos químicos em 103,4 e 65,1 ppm respectivos ao C-1 e C-5 das unidades de β -D-Xylp (SIMAS *et al.*, 2004; USOV; BILAN; SHASHKOV, 2007).

Em campo mais baixo os sinais em 174,9 e 170,7 ppm referem-se aos carboxílicos livres e metil-esterificados do ácido galacturônico, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1999; CIPRIANI *et al.*, 2004; COZZOLINO *et al.*, 2006). Os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos ressonaram em 52,8 ppm (COZZOLINO *et al.*, 2006; VRIESMANN, 2008). Em campo mais alto, é possível verificar ainda deslocamentos químicos em 16,5 e 20,2 ppm referentes ao $-\text{CH}_3$ das unidades de ramnose e grupamento acetil, respectivamente (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006).

A fração EAF-A1EpD, eluiu em um pico alargado, próximo ao volume total da coluna, separadamente das outras frações e apresentou o menor rendimento, indicando que é um componente minoritário. Apresentou espectro de RMN de ^{13}C diferente das outras frações. Na região anomérica (110 - 90 ppm) é possível visualizar um sinal intenso em 104,4 ppm referente às unidades de β -D-Galp (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; LIMA, 2008). São observados também deslocamentos químicos em 77,6; 74,5; 73,5; 72,1; 60,9 ppm, correspondentes ao C-4, C-5, C-3, C-2 e C-6, respectivamente, das unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-ligadas (GORIN; MAZUREK, 1975; FRANSEN *et al.*, 2000; LIMA, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009). É interessante destacar também a existência de um sinal com baixa intensidade que ressonou em 99,8 ppm correspondentes ao C-1 das unidades de α -D-GalpA não esterificadas. Esta fração mostra-se semelhante à fração EAF-A obtida a partir da estratégia 2.

As frações EAF-A1EpA, EAF-A1EpB, EAF-A1EpC e EAF-A1EpD foram submetidas à análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-

MALLS-RID). É possível visualizar perfis cromatográficos heterogêneos, polidispersos em todas as frações, indicando a presença de massas moleculares diferentes, eluindo após os 35 min (Figuras 49, 50, 51 e 52).

As frações EAF-A1EpA, EAF-A1EpB e EAF-A1EpC apresentam perfis cromatográficos bastante semelhantes, o que já foi visualizado em seus espectros de RMN de ^{13}C . Em todas as frações é possível observar um pico centrado em ≈ 38 min, detectado apenas pelo MALLS, devido a baixa concentração. Foram detectados picos por ambos detectores (índice de refração e espalhamento de luz) em ≈ 45 min, o que indica a alta concentração de moléculas de alta massa molecular. Picos eluindo em ≈ 50 min foram detectados apenas pelo RID, refletindo a presença de moléculas de baixa massa molecular.

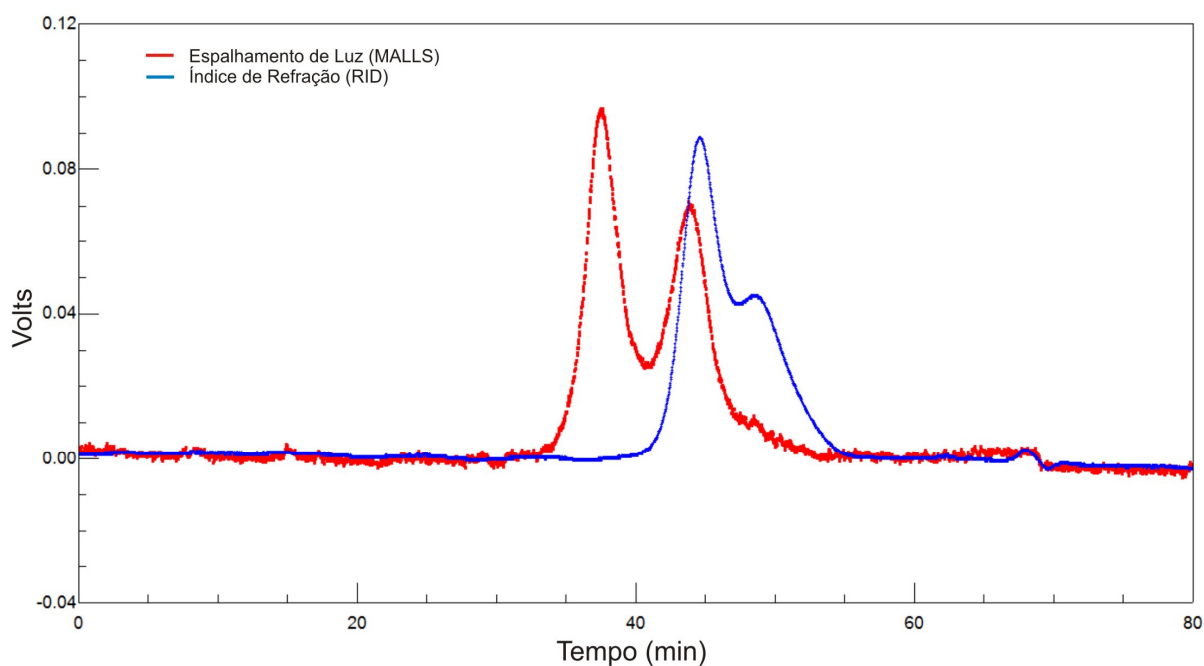


FIGURA 49 - CROMATOGRRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-A1EpA

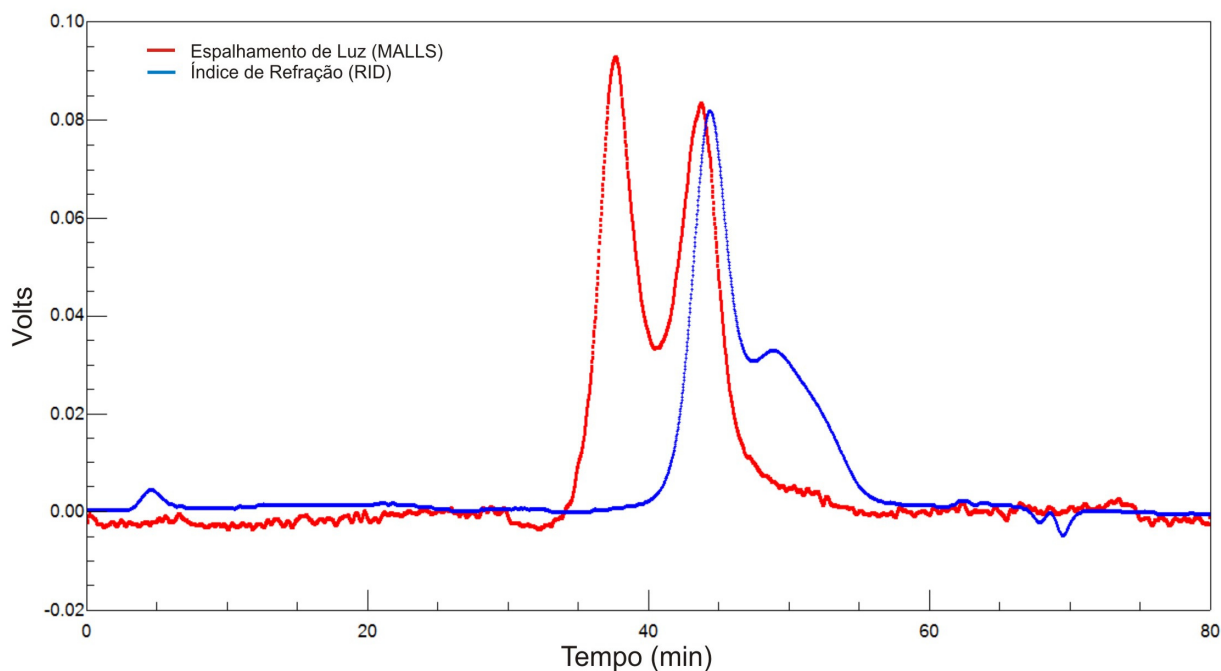


FIGURA 50 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-A1EpB

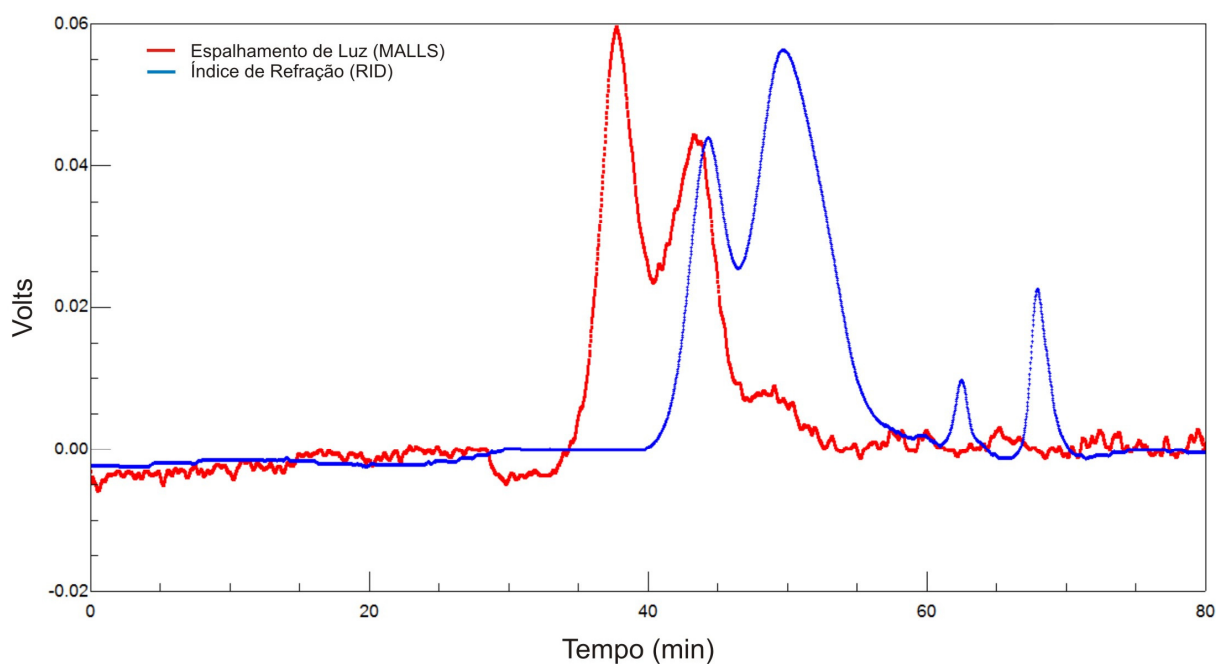


FIGURA 51 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-A1EpC

A fração EAF-A1EpD apresentou perfil cromatográfico distinto das demais frações, o que corrobora os dados de RMN de ^{13}C . É possível observar um pico centrado em ≈ 38 min, detectado apenas pelo MALLS, devido a baixa concentração. Em ≈ 45 min, observa-se um pico de baixa intensidade detectado por ambos

detectores (índice de refração e espalhamento de luz), indicando uma baixa concentração de moléculas de alta massa molecular e sugerindo que estas sejam as mesmas moléculas que estão presentes nas outras frações obtidas da cromatografia de exclusão. O pico eluindo em ≈ 50 min foi detectado apenas pelo RID, refletindo a presença de um polímero de baixa massa molecular que poderia representar a galactana, principal constituinte desta fração. O pico centrado em ≈ 68 min (volume total do sistema cromatográfico) indica a presença de traços de sal na amostra.

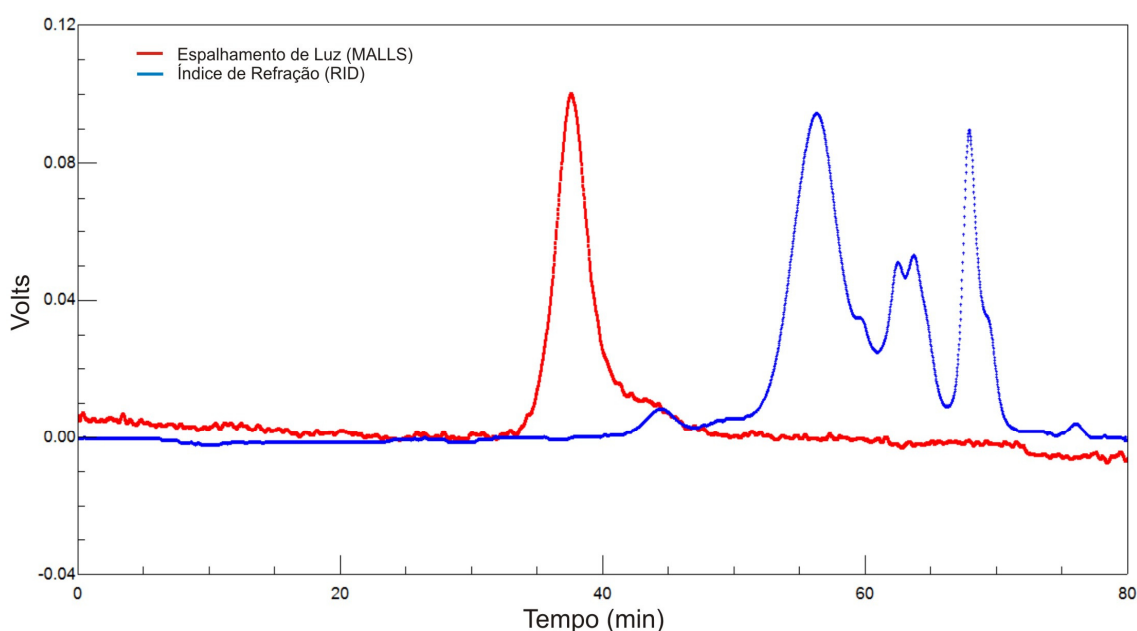


FIGURA 52 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO EAF-A1EpD

Na Figura 53 são apresentados os perfis de eluição das frações EAF-A1EpA-D comparadas com a fração de origem EAF-A1Ep. De acordo com o detector de índice de refração, é possível observar alta semelhança entre as frações, com exceção da fração EAF-A1EpD. Desta forma, juntamente com os dados de RMN (Figura 46), sugere-se que os dois picos que eluíram entre 40 e 54 min são referentes a moléculas de pectinas.

Com base nos resultados acima descritos é possível afirmar que a cromatografia de exclusão em Sepharose 6B foi eficiente para permitir a separação de subfrações constituídas principalmente por polissacarídeos de elevada massa molar, caracterizados como pectinas (subfrações A-C) e uma subfração que apresenta uma galactana de relativa baixa massa molar (subfração D).

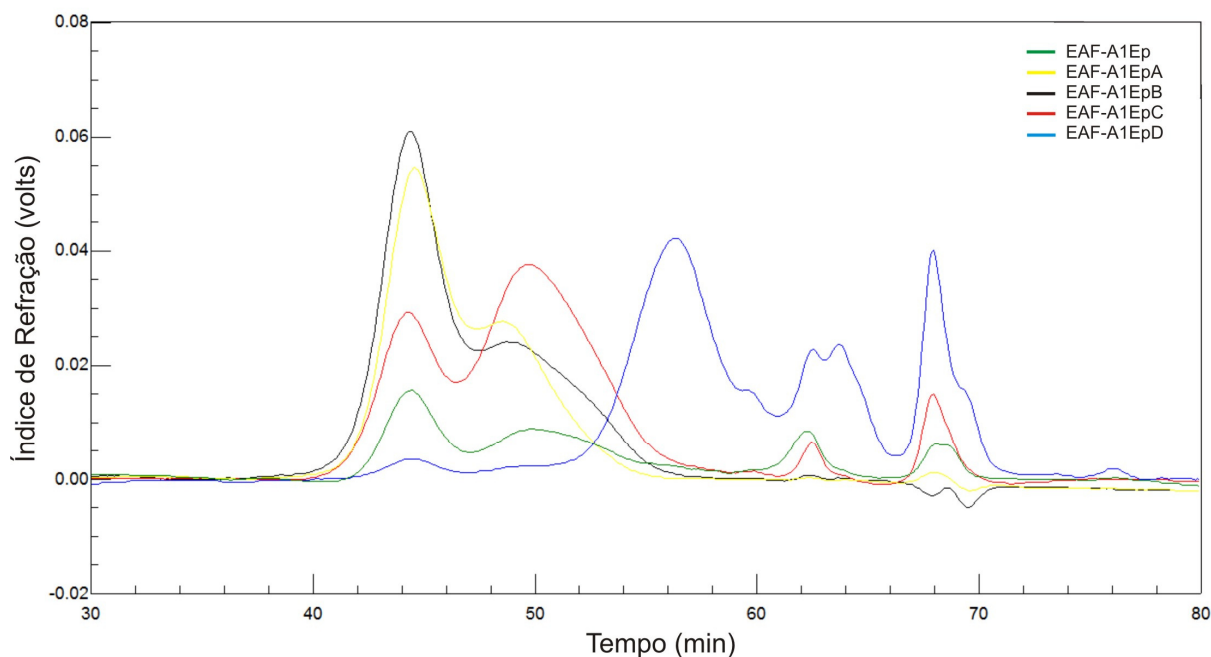


FIGURA 53 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO (EAF-A1EpA, EAF-A1EpB, EAF-A1EpC, EAF-A1EpD) EM COMPARAÇÃO COM A FRAÇÃO EAF-A1Ep

Embora não foi possível determinar a estrutura química fina de todas as moléculas isoladas, com apenas as análises aqui empregadas, o presente trabalho esboçou várias características gerais dos polímeros nativos e quimiotransformados obtidos a partir de cada uma das diferentes estratégias de extração utilizadas. Estas frações obtidas a partir do farelo de soja foram avaliadas quanto a sua capacidade de ligação a bactérias enteropatogênicas (*Salmonella* sp.) e os resultados são apresentados a seguir.

6.2 ESTUDOS BIOLÓGICOS *In Vitro*

6.2.1 Ensaio de capacidade de ligação

Os ensaios de capacidade de ligação a bactérias enteropatogênicas foram realizados segundo as metodologias propostas por Becker *et. al* (2007) e Ganner *et al.* (2010), onde a quantidade de bactéria aderida as frações testadas é mensurada através da densidade óptica das soluções, o que indica o crescimento das bactérias

aderidas. A taxa de crescimento é, portanto, dependente do número de bactérias que aderiram. Um alto número de ligações resulta em um crescimento mais rápido e desta forma as bactérias entram mais cedo na fase exponencial de crescimento.

Este ensaio compreende quatro etapas principais: incubação das amostras de interesse; bloqueio dos espaços não ocupados pelas amostras e prevenção de ligações inespecíficas com BSA; incubação da bactéria e, por fim, adição de meio de cultura e leitura das densidades ópticas. Em todas as placas foram utilizados controles em triplicata que consistiram em: controle de ligação, controle de crescimento, branco da amostra e controle do meio de cultura.

O controle de ligação consistiu de BSA e bactéria sem adição das moléculas de interesse a fim de eliminar os sítios de ligação inespecíficos. Por ser um produto proteínico puro, o BSA se difere da típica matriz de adesão aos carboidratos. No entanto não se pode esperar que ele se comporte de maneira inerte perante a bactéria (BECKER; GALLETI, 2008). Desta forma, espera-se apenas um crescimento mais lento quando comparado a todas as frações testadas. Nos ensaios com BSA, não ocorreu crescimento antes de bactérias antes de 5 h.

O controle de crescimento consistiu de uma suspensão de bactérias (*Salmonella* sp.) com OD 0,01 adicionada à poços, previamente bloqueados com BSA, apenas na quarta etapa do processo. Através desse controle foi possível identificar eventuais problemas ocorridos durante todo o processo de crescimento bacteriano.

O branco da amostra consistiu de amostra e BSA sem adição de células bacterianas, incluindo todas as etapas do teste, a fim de identificar possíveis contaminações da amostra com outras bactérias. O controle do meio de cultura consistiu em BSA e meio, não havendo crescimento antes de 10 h.

A concentração de carboidratos requerida para efetiva inibição de adesão *in vitro* é alta, porque a afinidade de sacarídeos para lectinas bacterianas é baixa (OFEK; HASTY; SHARON, 2003). Desta forma a concentração escolhida para a realização dos ensaios foi de 1%, ou seja, 3 mg/poço.

Um detalhe importante a ser destacado é o uso das placas com superfície de poliestireno de alta ligação que possibilitam a ligação de moléculas. Isso se deve ao fato do poliestireno ter sido modificado para um estado elevado de ligação pelo uso de radiação. A radiação incorpora efetivamente ácido carboxílico sobre os carbonos acessíveis do anel de benzeno "quebrado". A superfície resultante é

essencialmente hidrofóbica com intermitentes grupos carboxílicos capazes de interações iônicas com grupos carregados positivamente em biomoléculas. O mecanismo de imobilização é passivo de adsorção através de interações hidrofóbicas e iônicas (CORNING, 2012). Como matrizes alternativas de adesão ao intestino consistem principalmente de compostos glicosilados, desta forma placas de poliestireno de alta ligação medeiam ligação de produtos via ligações de hidrogênio (BECKER *et al.*, 2007).

6.2.1.1 Curva Padrão

O primeiro passo realizado para que a capacidade de adesão fosse determinada foi a construção de uma curva de calibração. Para tanto, uma suspensão de *Salmonella typhimurium* com densidade óptica de 0,1 foi submetida a diluição seriada. Após o período de incubação (18 h) e obtenção das suas respectivas densidades ópticas, curvas de crescimento foram plotadas (Gráfico 1). Uma regressão linear foi então compilada plotando UFC.mL⁻¹ contra o tempo de detecção das diluições em série quando o crescimento bacteriano atinge densidade óptica de 0,1 (Gráfico 2). Usando a equação da regressão linear, a quantidade desconhecida de bactérias ligada é calculada de acordo com o tempo de detecção. Em um intervalo linear, foi possível a detecção das densidades celulares entre $4,8 \times 10^4$ e $4,8 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹.

É possível confirmar através dos Gráficos 1 e 2 a relação densidade celular e tempo. Quanto menor for a densidade celular da solução, maior será o tempo para que o crescimento bacteriano atinja densidade óptica de 0,1, o inverso também é verdadeiro. Isto está completamente relacionado à capacidade de ligação com as moléculas de interesse a serem testadas. Quanto maior o número de bactérias aderidas, mais rápido acontecerá o crescimento bacteriano e o tempo para que OD 0,1 seja atingida será menor.

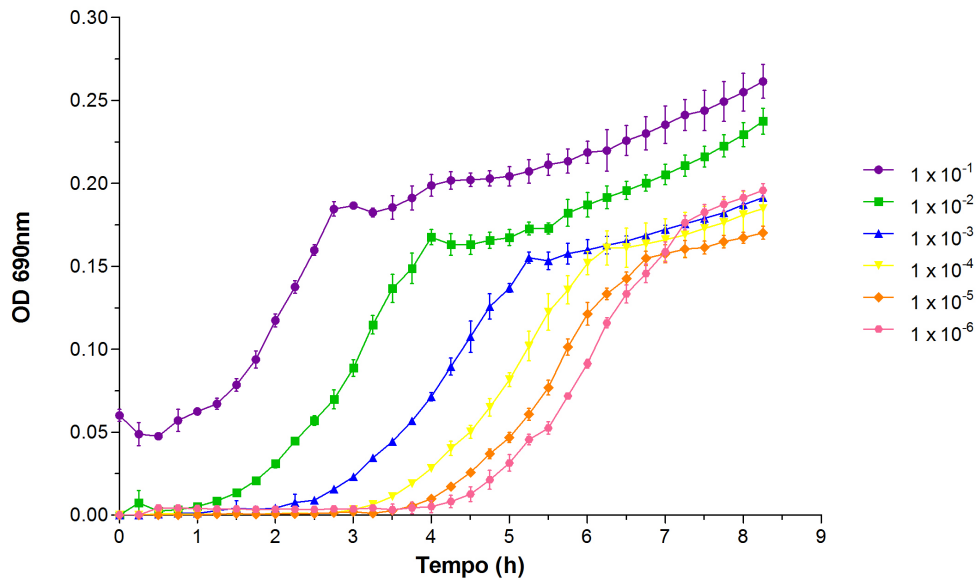


GRÁFICO 1 - CONTROLES DE CRESCIMENTO, DILUIÇÃO EM SÉRIE DE *Salmonella typhimurium*

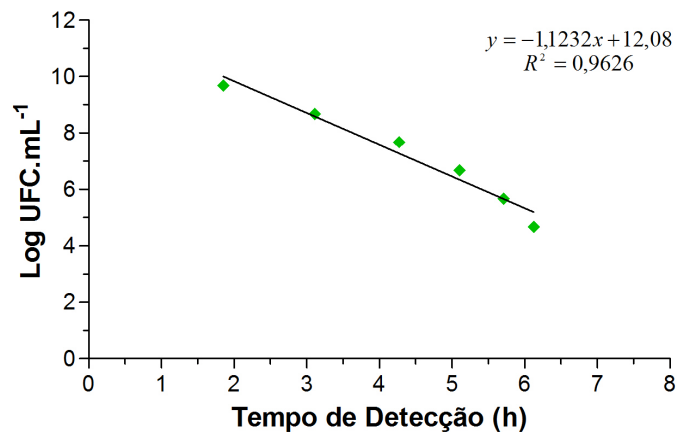


GRÁFICO 2 - REGRESSÃO LINEAR PARA *Salmonella typhimurium*. TEMPO DE DETECÇÃO EM HORAS QUANDO O CRESCIMENTO BACTERIANO ATINGE DENSIDADE ÓPTICA DE 0,1

6.2.1.2 Amostras

Devido ao alto número de frações disponíveis para serem testadas quanto à capacidade de ligação a *Salmonella typhimurium*, optou-se primeiramente realizar um *screening* inicial (Figura 54). Neste *screening* diferentes frações foram testadas e comparadas ao produto comercial BioMos® (*Alltech*). As frações que apresentaram

resultados melhores ou semelhantes ao produto comercial foram analisadas novamente.

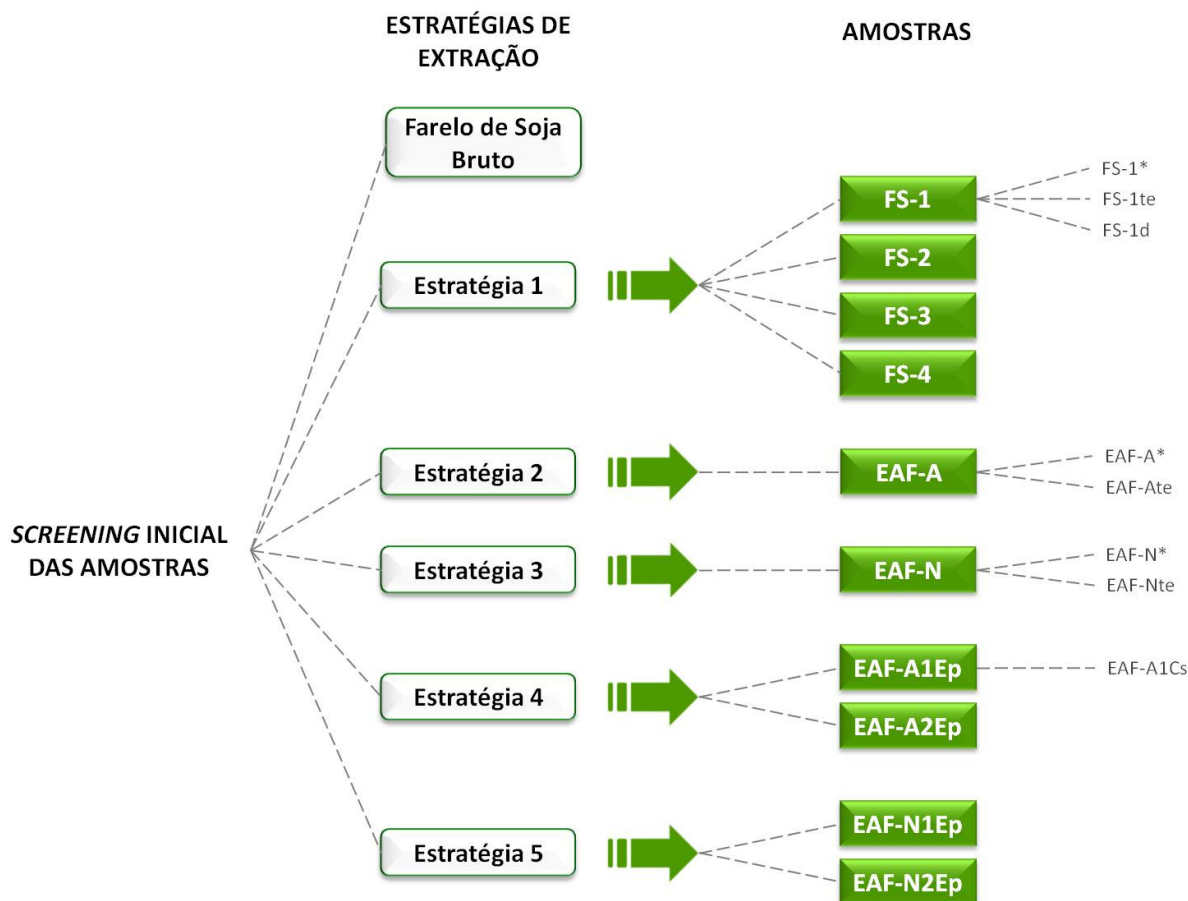


FIGURA 54 - *SCREENING* INICIAL DAS AMOSTRAS UTILIZADO PARA O TESTE DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO. FRAÇÕES QUE APRESENTAM “*” EM SUA NOMENCLATURA INDICAM QUE PROCESSO DE SONICAÇÃO FOI EXCLUÍDO A FIM DE VERIFICAR A IMPORTÂNCIA DESTA ETAPA

Os resultados obtidos deste *screening* inicial podem ser observados sob duas formas: UFC.mL^{-1} (Gráfico 3) e percentagem de ligação em relação ao BioMos[®] (Gráfico 4). O número de bactérias aderidas, em todas as frações, foi determinado através da regressão linear, descrita no item anterior (6.2.1.1).

Comparando-se o número médio de bactérias aderidas de cada uma das frações ao produto comercial (Gráfico 3) foi possível verificar algumas informações preliminares importantes. Todas as frações que não foram sonicadas (FS-1*, EAF-A* e EAF-N*), durante a primeira etapa do teste de capacidade de ligação, apresentaram resultados inferiores se comparadas as mesmas frações quando estas sofreram o processo de sonicação. Frações brutas, sem tratamentos de purificação, tendem a possuir melhor capacidade de ligação do que frações tratadas.

Isso pode ser observado claramente nas frações obtidas a partir da estratégia 1 e 3. As frações FS-1 e EAF-N apresentaram capacidade de ligação superior ao BioMos[®], diferentemente de suas derivadas FS-1te e EAF-Nte, que sofreram tratamento enzimático para eliminação de proteínas, apresentam atividade inferior a das frações que as originaram. As frações oriundas das estratégias 4 e 5 apresentaram capacidade de ligação inferiores ao produto comercial e às demais frações. As frações nativas FS-1, FS-1d, FS-2, FS-3 e FS-4, provindas da estratégia 1, apresentaram capacidade de ligação bem superior ao BioMos[®], e superior as demais frações. O farelo de soja bruto também foi testado. Seu resultado indica uma capacidade de ligação igual ao produto comercial.

Estabelecendo o produto comercial (BioMos[®]) como 100% de ligação e comparando com os resultados de cada uma das frações (Gráfico 4), é possível verificar com maior clareza as frações que se destacaram. Cada fração foi comparada ao produto comercial da sua placa. A fração FS-1d apresentou capacidade de ligação 3000% maior que o produto comercial. Novamente as frações nativas FS-1, FS-2, FS-3 e FS-4 apresentaram-se melhores que o produto comercial com percentuais variando entre 140 a 300%. As frações decorrentes das estratégias 2 e 3, apresentam de modo geral, capacidade de ligação semelhante ao BioMos[®]. As frações oriundas das estratégias 4 e 5 demonstraram capacidade de ligação bem inferior ao produto comercial.

A capacidade de ligação das frações que se destacaram serão abordadas mais profundamente no próximo sub-item (6.2.1.2.1).

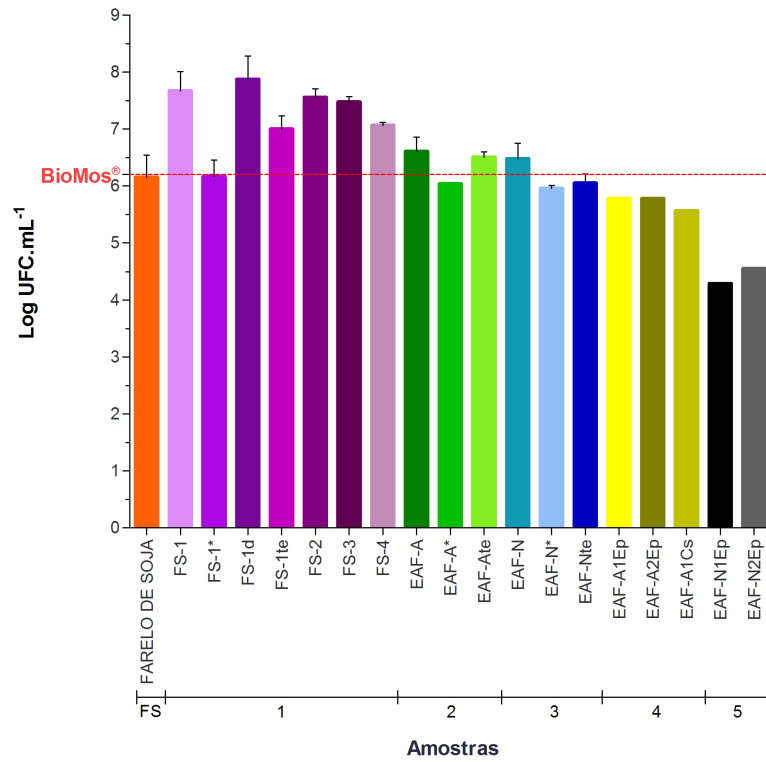


GRÁFICO 3 - PERCENTAGEM DE LIGAÇÃO EM RELAÇÃO AO BIOMOS[®] DAS FRAÇÕES TESTADAS NO SCREENING INICIAL. FS: FARELO DE SOJA; 1, 2, 3, 4, 5: FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DAS ESTRATÉGIAS 1, 2, 3, 4 E 5 DE EXTRAÇÃO, RESPECTIVAMENTE

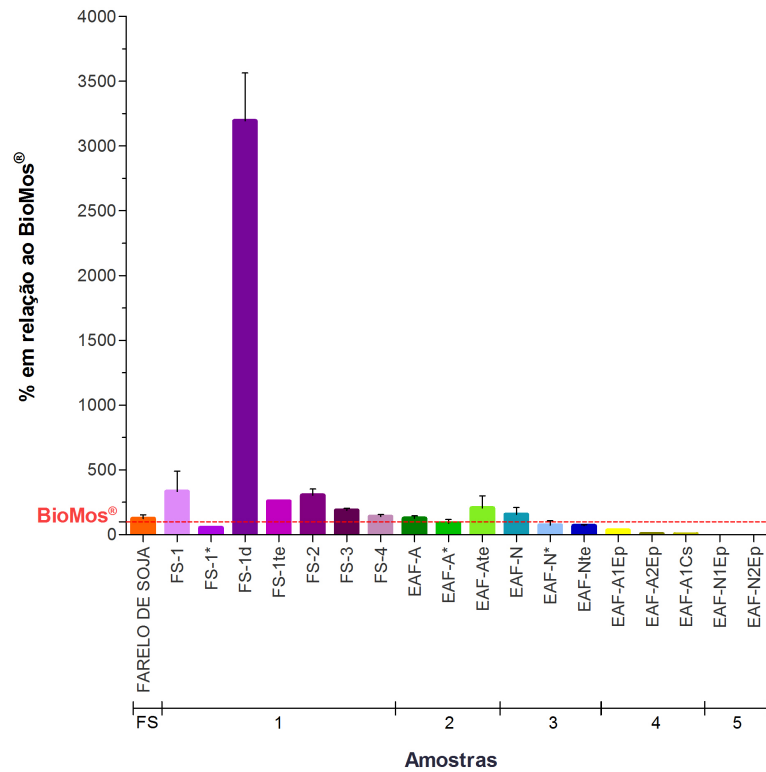


GRÁFICO 4 - CAPACIDADE DE LIGAÇÃO (UFC.mL⁻¹) DAS FRAÇÕES TESTADAS NO SCREENING INICIAL. FS: FARELO DE SOJA; 1, 2, 3, 4, 5: FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DAS ESTRATÉGIAS 1, 2, 3, 4 E 5 DE EXTRAÇÃO, RESPECTIVAMENTE

6.2.1.2.1 Curvas de crescimento

As frações que se destacaram no *screening* inicial foram analisadas em mais um, dois ou três ensaios, dependendo da quantidade de amostra disponível. Em cada ensaio as amostras foram testadas em quintuplicata. O coeficiente de variação intra e inter ensaios foi de aproximadamente 5%, valor este semelhante à Ganner, et. al (2010). Para minimizar ainda mais o coeficiente de variação, todos os ensaios deveriam ser realizadas com o mesmo lote de inóculo. No entanto, isto é discutível, uma vez que esta variação pode ser decorrente da quantidade de produto imobilizado na placa (primeira etapa do ensaio), fator este desconhecido neste teste automatizado (BECKER *et al.*, 2007).

A quantidade de números de adesão (UFC/3mg) entre bactérias e amostras de interesse está listada na Tabela 11. Elas foram calculadas baseadas na regressão linear apresentada anteriormente. As curvas de crescimento de cada uma das frações testadas estão apresentadas no Gráfico 5, e estão organizadas de acordo com as estratégias de extração que as originou.

As frações nativas (estratégia de extração 1) destacaram-se entre as demais frações. A fração FS-1d, apresentou a maior quantidade de células ligadas/3 mg (massa da fração testada por poço da placa), $1,11 \times 10^8$ UFC; seguida pelas frações FS-1, FS-2, FS-3, FS-4 e FS-1te que apresentaram quantidades de células bacterianas ligadas entre $5,74 \times 10^7$ e $7,15 \times 10^6$ UFC (Gráfico 5A).

A fração FS-1d é originária da fração FS-1, e sofreu apenas uma diálise em membrana de 2 kDa contra água destilada. Após diálise esta fração mostrou-se com alta capacidade de ligação. Análises químicas identificaram alto teor de proteínas e baixo teor de carboidratos após o processo de diálise. Outra importante mudança entre a fração mãe e sua derivada é a eliminação da sacarose, comprovada através de espectroscopia de RMN de ^{13}C . Ao realizar o tratamento enzimático, observa-se uma redução significativa nesta capacidade de ligação. Isto pode ter acontecido em decorrência de possíveis quebras na biomolécula, e unidade protéicas importantes terem sido eliminadas, razão esta da diminuição da atividade após este tratamento. Esses dados, juntamente com os dados de capacidade de ligação podem indicar que as proteínas são estruturas importantes para que a ligação ocorra, uma vez que

já foi descrito na literatura que as bactérias podem expressar mais de um tipo de adesina (OFEK; HASTY; SHARON, 2003).

As frações FS-1, FS-2, FS-3 e FS-4 também apresentaram alta capacidade de ligação. Observa-se que esta capacidade é maior em FS-1 e é reduzida gradativamente nas outras frações, variando de $5,74 \times 10^7$ na fração FS-1 até $1,16 \times 10^7$ na fração FS-4. Estas frações foram extraídas sequencialmente em água destilada variando a temperatura: 25°C nas duas primeiras extrações e a 80°C nas duas posteriores. Análises químicas demonstraram que o teor de carboidratos diminui sequencialmente nessas frações, bem como o teor de proteínas aumenta. Observa-se, portanto um padrão, quanto maior o teor de carboidratos maior foi a capacidade de ligação.

TABELA 11 - QUANTIDADE DE BACTÉRIA LIGADA POR 3 MG DA FRAÇÃO TESTADA

Frações	UFC/3mg
FS-1d	$1,11 \times 10^8$ ^{aA}
FS-1	$5,74 \times 10^7$ ^{aA}
FS-2	$3,79 \times 10^7$ ^{aA}
FS-3	$2,02 \times 10^7$ ^{aA}
FS-4	$1,16 \times 10^7$ ^{aB}
FS-1te	$7,15 \times 10^6$
EAF-A	$4,67 \times 10^6$
EAF-N	$3,48 \times 10^6$
EAF-Ate	$3,24 \times 10^6$
BioMos[®]	$1,78 \times 10^6$ ^{bB}
Farelo de Soja	$1,88 \times 10^6$
EAF-Nte	$1,1 \times 10^6$

FS-1d: Fração retida após diálise de FS-1 em membrana de 2kDa; FS-1, FS-2: Frações obtidas por extrações aquosas a 25°C ; FS-3, FS-4: Frações obtidas por extrações aquosas a 80°C ; FS-1te: Fração obtida após tratamento de FS-1 com Pronase E; EAF-A: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 2 (extração ácida); EAF-N: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 3 (extração neutra); EAF-Ate: Fração obtida após tratamento de EAF-A com Pronase E; EAF-Nte: Fração obtida após tratamento de EAF-N com Pronase E; ^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey: $P < 0,05$). ^{A, B} Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey: $P < 0,001$).

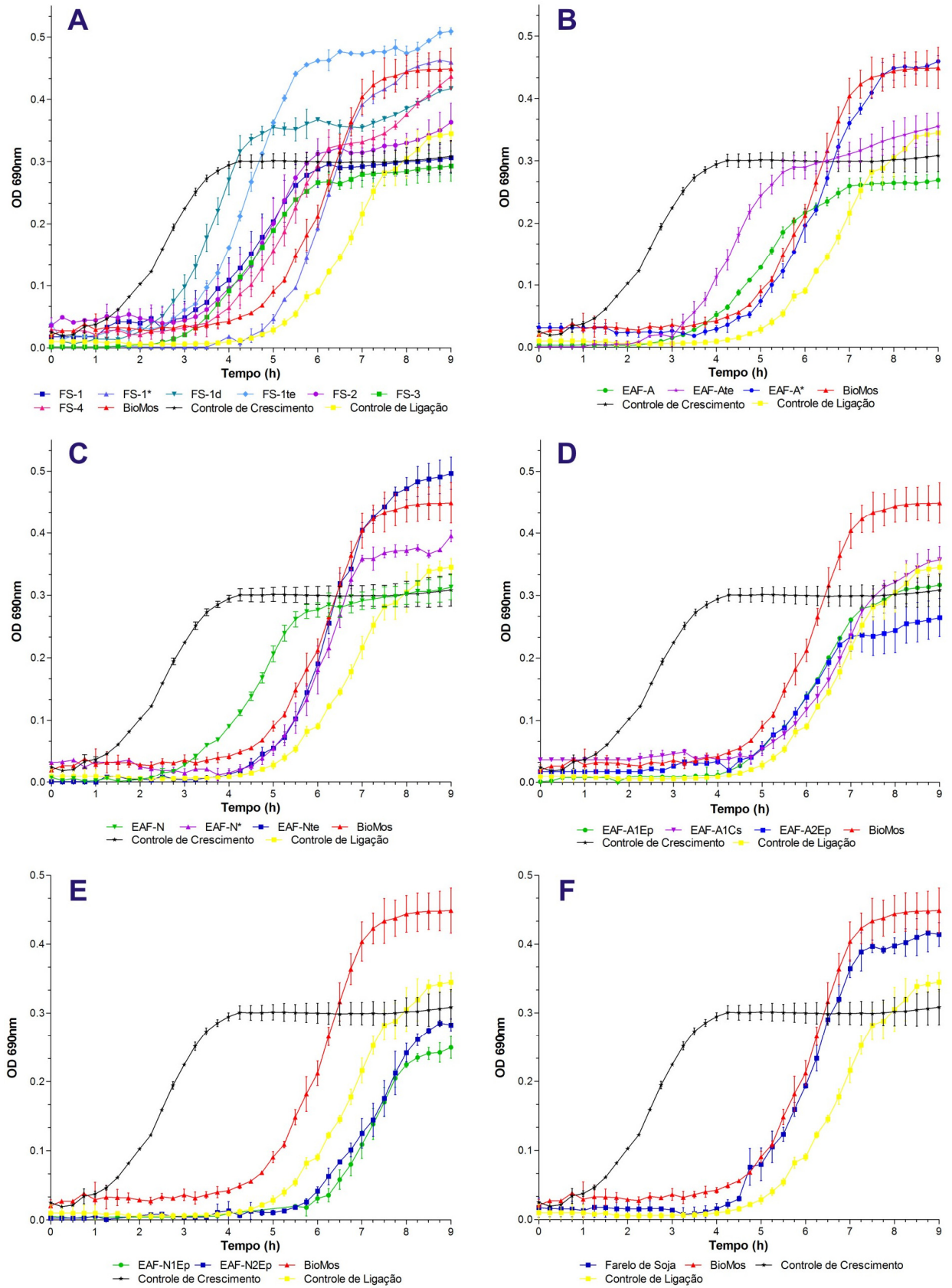


GRÁFICO 5 - CURVAS DE CRESCIMENTO. A, B, C, D, E: FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DAS ESTRATÉGIAS 1, 2, 3, 4 E 5 DE EXTRAÇÃO, RESPECTIVAMENTE. F: FARELO DE SOJA

Spring *et al.* (2000) sugerem, baseados em testes de inibição de aglutinação, que a frutose seja um agente bloqueador para *S. typhimurum*, porém menos efetivo que unidades de manose. Como foi observado através de RMN de ^{13}C e HPSEC, a fração FS-1 contém sacarose. A sacarose é um dissacarídeo não redutor formado por α -D-glucopiranosose - (1 \rightarrow 2) - β -D-frutofuranose (NELSON; COX, 2006). Bactérias não reconhecem apenas terminais redutores de carboidratos, os reconhecem também em ligações internas (SHARON; OFEK, 2000), desta forma é possível que a frutose, pertencente à unidade de sacarose, esteja auxiliando neste bloqueio da enterobactéria.

As frações EAF-A e EAF-Ate (estratégia 2) apresentaram quantidades de bactérias ligadas de $4,67 \times 10^6$ e $3,24 \times 10^6$ UFC (Gráfico 5B). Esses resultados não mostraram diferença significativa ao BioMos[®], porém se mostram importantes, uma vez que apresentaram resultados estatisticamente equiparáveis a capacidade de ligação do produto comercial testado. Estas frações são semelhantes, tendo a galactose como açúcar majoritário, mesmo após o tratamento enzimático. O fato do teor de proteínas ter sido reduzido de aproximadamente 60% (EAF-A) para 9% (EAF-Ate) não afetou a capacidade de ligação desta fração, sugerindo que as proteínas e carboidratos envolvidos no mecanismo de ligação permaneceram na fração após o tratamento.

Da mesma forma as frações EAF-N e EAF-Nte (estratégia 3) também apresentaram resultados importantes, porém não diferentemente significativos quando comparados ao produto comercial. Essas frações demonstraram capacidade de aderir $3,24 \times 10^6$ (EAF-N) e $1,1 \times 10^6$ (EAF-Nte) (Gráfico 5C). A fração EAF-N após o tratamento enzimático gerou a fração EAF-Nte, fração esta bastante diferente, onde o ácido galacturônico é o açúcar majoritário. É possível que a clivagem das proteínas pela enzima tenha gerado polissacarídeos e proteínas de menor massa que foram eliminados durante o processo de diálise. Esses polissacarídeos e proteínas eliminados poderiam estar envolvidos no processo de ligação à bactéria, fato este que estaria ligado à diminuição da capacidade de ligação da fração mãe após este tratamento.

A fim de verificar a importância da sonicação para as frações FS-1, EAF-A e EAF-N, frações estas que apresentaram resultados importantes de capacidade de ligação, foram realizados ensaios eliminando esta etapa do processo. Espectros de RMN de ^{13}C foram realizados com estas frações adicionando a etapa de sonicação

antes da realização do experimento. Através das curvas de crescimento é possível observar que todas as frações que não foram sonicadas (FS-1*, EAF-A*, EAF-N*) necessitaram de maior tempo para atingir sua fase exponencial que as frações sonicadas. Através de espectroscopia de RMN de ^{13}C não foi possível observar nenhuma diferença entre os espectros das frações sonicadas e não sonicadas. Cabe lembrar que o experimento de RMN foi realizado com a amostra solubilizada em água deuterada, e as amostras nos ensaios de capacidade de ligação foram solubilizadas em solução tampão, desta forma, o processo de sonicação pode estar apenas melhorando a solubilização das estruturas insolúveis em água, porém solúveis em solução salina. Outras metodologias de análise devem ser aplicadas para se tentar averiguar as mudanças que o processo de sonicação está ocasionando na estrutura dessas amostras e conseqüentemente em sua capacidade de ligação.

As frações EAF-A1Ep, EAF-A1Cs, EAF-A2Ep, EAF-N1Ep, EAF-N2Ep (Estratégia 4 e 5) não foram analisadas estatisticamente, pois foram rejeitadas durante a fase do *screening* inicial por apresentarem capacidade de ligação bastante inferior ao produto comercial existente. No entanto, da mesma forma que para as outras frações, curvas de crescimento foram plotadas a fim de observar o crescimento das bactérias nessas moléculas (Gráfico 5D e 5E). É possível observar através dessas curvas que as amostras oriundas da estratégia 4 apresentaram um perfil de crescimento semelhante ao controle de ligação, que consiste apenas de BSA e bactéria. As amostras oriundas da estratégia 5, apresentaram um perfil de crescimento pior que o controle de ligação. Essas informações sugerem que não houve ligação detectável com a bactéria *S. typhimurum*. Becker *et al.* (2007) sugerem que as curvas que aparecem muito mais tarde que as curvas de adesão de todas as outras frações podem corresponder a contaminações, uma vez que se trabalha com amostras não estéreis.

O farelo de soja bruto também foi analisado. O número de bactérias aderidas foi de $1,88 \times 10^6$ UFC, resultado este semelhante ao produto comercial que foi de $1,78 \times 10^6$ UFC (Gráfico 5F). Para o ensaio, o farelo foi solubilizado a 1% em PBS, porém ele é bastante insolúvel. Testes devem ser realizados a fim de detectar quais biomoléculas ficaram solúveis em solução salina e estão ocasionando uma boa capacidade de ligação.

6.2.1.2.2 Mecanismos de ligação

Sacarídeos são ideais como agentes anti-adesão de bactérias patogênicas, pois são atóxicos, não mutagênicos e não são bactericidas, evitando-se o risco de resistência (SHARON; OFEK, 2000).

Neeser, Koellreutter e Wuersch (1986), Kiers *et al.* (2002), Kiers *et al.* (2003), Becker *et al.* (2007) e Becker e Galletti (2008) já demonstraram em seus trabalhos a capacidade da soja em adsorver enterobactérias como *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* de modo a evitar a colonização subsequente do patógeno. A teoria mais difundida para explicar esta interação é a dos receptores análogos, onde a enterobactéria (p.e. *Salmonella* sp.), através das lectinas localizadas nas fímbrias, se ligará a manose livre (fenômeno de adsorção) devido a sua alta disponibilidade e concentração, evitando o processo de adesão ao tecido do hospedeiro e conseqüentemente a infecção (OFEK; MIRELMAN; SHARON, 1977; OFEK; HASTY; SHARON, 2003; MORAN, 2011).

Becker *et al.* (2007) e Becker e Galletti (2008) realizaram experimentos com *Salmonella typhimurium*. A capacidade de ligação evidenciada para soja, assim como para diversos outros produtos, é dita como decorrente da presença de manoses nesses extratos e sua respectiva ligação às lectinas da bactéria. As pesquisas base para a afirmação de presença de manose na soja foram feitas por Whistler e Saarnio (1957) que isolaram galactomananas da casca da soja, numa proporção de 2% de rendimento, tendo uma relação 2:3 de unidades de galactose e manose; e Hsiao, Anderson e Dalet (2006) que isolaram de farelo de soja, β -mananas em teores variando entre 1,26 - 1,61%.

Com base nesta hipótese, de que a manose é o fator determinante para que haja ligação entre a bactéria e carboidratos, a Tabela 12 compila os dados de composição monossacarídica das frações testadas a fim de observar os teores de manose presentes.

Observa-se que as frações possuem, em maioria, ácido urônico e galactose como componentes majoritários. Outros açúcares se fazem presentes em menores quantidades. Os teores absolutos de variaram entre 0 – 2,3%.

A fração FS-1d apresentou o maior número de bactérias aderidas e o maior teor absoluto de manose (2,3%), indicando que a manose disponível pode estar

funcionando como um receptor para as adesinas da *S. typhimurium*. Outras frações que se diferenciaram significativamente do produto comercial foram FS-1, FS-2, FS-3 e FS-4. Estas frações apresentaram teores absolutos de manose variando entre 0,2 e 1,3%. Todas estas frações apresentaram teores elevados de proteínas (31,5 – 87,2%). É possível que essas proteínas, além da manose, possam estar envolvidas no processo de adesão (OFEK; HASTY; DOYLE, 2003), uma vez que as bactérias podem expressar mais de um tipo de adesina durante este processo (OFEK; HASTY; SHARON, 2003).

TABELA 12 - ANÁLISES QUÍMICAS, COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E NÚMERO DE BACTÉRIAS ADERIDAS DAS FRAÇÕES TESTADAS QUANTO A SUA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO

Fração	PTN (%) ^b	CHO Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d								Teor absoluto de manose (%) ^f	UFC/3mg
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e		
Estratégia 1												
FS-1	31,5	42,5	Tr	Tr	8,0	Tr	3,0	50,2	31,3	7,5	1,3	5,74 x 10 ⁷
FS-1d	86,6	13,4	7,8	2,5	16,8	3,2	17,5	18,7	8,7	24,9	2,3	1,11 x 10 ⁸
FS-2	66,0	8,2	1,5	Tr	24,2	3,8	9,6	23,4	10,7	26,8	0,8	3,79 x 10 ⁷
FS-3	87,0	4,0	2,2	1,2	30,4	1,8	26,6	17,8	10,1	10,0	1,1	2,02 x 10 ⁷
FS-4	87,2	3,6	2,3	1,7	17,4	3,5	6,6	16,2	27,3	25,0	0,2	1,16 x 10 ⁷
Estratégia 2												
EAF-A	59,8	30,8	3,5	1,2	19,8	6,2	1,2	31,7	5,5	30,8	0,4	4,67 x 10 ⁶
EAF-Ate	8,8	65,5	4,6	1,0	4,9	5,1	0,9	25,4	0,6	57,5	0,6	3,24 x 10 ⁶
Estratégia 3												
EAF-N	57,2	16,5	2,8	1,1	33,7	4,5	3,5	19,0	6,4	29,1	0,6	3,48 x 10 ⁶
EAF-Nte	31,4	36,2	2,7	0,8	8,6	2,6	1,6	4,6	1,7	77,2	0,6	1,1 x 10 ⁶
Estratégia 4												
EAF-A1Ep	4,7	93,9	6,6	1,1	8,8	10,9	1,7	22,4	4,0	44,4	1,6	-
EAF-A2Ep	8,2	89,2	5,6	Tr	0,9	12,2	0,9	15,3	3,4	61,6	0,8	-
Estratégia 5												
EAF-N1Ep	3,9	79,0	5,9	2,1	21,2	8,7	2,5	27,3	2,4	30,2	2,0	-
EAF-N2Ep	3,4	73,7	4,3	2,2	29,8	5,2	Tr	30,9	Tr	27,7	0	-

PTN: Proteínas; CHO: Carboidratos; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; FS-1, FS-2: Frações obtidas por extrações aquosas a 25°C; FS-3, FS-4: Frações obtidas por extrações aquosas a 80°C; FS-1d: Fração retida após diálise de FS-1 em membrana de 2kDa; EAF-A: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 2 (extração ácida); EAF-Ate: Fração obtida após tratamento de EAF-A com Pronase E; EAF-N: Fração solúvel obtida a partir da Estratégia 3 (extração neutra); EAF-Nte: Fração obtida após tratamento de EAF-N com Pronase E; EAF-A1Ep, EAF-A2Ep: Frações polissacarídicas obtidas a partir da Estratégia 4 (extração ácida seguida de precipitação com TCA e etanol); EAF-N1Ep, EAF-N2Ep: Frações polissacarídicas obtidas a partir da Estratégia 5 (extração neutra seguida de precipitação com TCA e etanol); ^a Rendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^b LOWRY *et al.* (1951); ^c DUBOIS *et al.* (1956); ^d Monossacarídeos neutrosquantificados na forma de acetatos de alditóis por GLC; ^e FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991); ^f Valor determinado a partir dos teores de carboidratos totais e manose; Tr: Traço (≤1%); -: Não determinado.

As frações EAF-A, EAF-Ate e EAF-N obtiveram resultados semelhantemente importantes, apresentando um bom número de bactérias aderidas, equiparando-se ao produto comercial, como já comentado anteriormente (6.2.1.2.1). Pode-se observar que os teores absolutos de manose nas frações EAF-A e EAF-N são semelhantes (0,4 e 0,6%, respectivamente), fato que pode estar relacionado com a semelhança entre os resultados de capacidade de ligação. Os teores absolutos de manose duplicam após a fração EAF-A sofrer o tratamento enzimático, no entanto sua capacidade de ligação não é aumentada. Isto pode indicar que outras biomoléculas podem estar envolvidas no processo de adesão.

É possível observar também que as frações EAF-A1Ep, EAF-A2Ep, EAF-N1Ep e EAF-N2Ep que não apresentaram ligações detectáveis com a bactéria *S. typhimurium* apresentam-se com teores absolutos de manose variando entre 0 – 2,0% (valores absolutos), semelhantemente a outras frações. Baseado nisso, é possível evidenciar que a presença de manose não é o único fator responsável pela ligação da bactéria à molécula de interesse, outros fatores/biomoléculas podem estar participando deste processo.

Hipóteses podem ser lançadas a respeito do mecanismo de adesão da *S. typhimurium*, tais como: a manose mesmo em pequenos teores funciona como receptor análogo aos carboidratos reconhecidos pelas lectinas das fímbrias do tipo I; outros tipos de fímbrias já descritas para a *Salmonella* podem estar envolvidos de alguma forma no processo de adesão; a soja é um potente fornecedor de proteínas, essas proteínas podem estar relacionadas com o processo de adesão; a presença de biomoléculas específicas pode estar inibindo/dificultando o processo de ligação.

Diante de todos esses resultados é importante dar destaque para algumas informações:

- o mecanismo anti-adesão não está totalmente elucidado, o que se têm são hipóteses e evidências (SPRING; PRIVULESCU, 2012; HAJATI; REZAEI, 2010);
- a *Salmonella typhimurium* apresenta uma série de adesinas, porém a função de muitas delas não foram completamente compreendidas (WAGNER; HENSEL, 2011);
- informações sobre polissacarídeos e suas fontes de obtenção, acessibilidade, concentração e possíveis estruturas dos receptores

para adesão bacteriana ainda não estão explícitas (BECKER; GALLETTI, 2008).

É com base nesses detalhes, que estudos sobre carboidratos e sua possível função de receptores análogos em terapias anti-adesão, ganham evidência. Mais estudos são necessários, a fim de tentar elucidar as informações acima e poder afirmar com certeza como acontece a ligação entre os receptores e as bactérias e consequentemente poder definir qual é a melhor molécula para esta aplicação.

7. CONCLUSÃO

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

- As extrações aquosas à 25 e 80 °C (Estratégia 1) não foram eficientes para a extração de polissacarídeos. As frações nativas, obtidas a partir desta estratégia, são compostas por alto teor de proteínas e baixos teores de carboidratos, com exceção da fração FS-1, a qual apresentou o maior teor de carboidratos entre as frações nativas, sendo estes oligossacarídeos, majoritariamente sacarose;
- A estratégia 2 originou um polissacarídeo quimiotransformado, composto principalmente por unidades de β -D-Galp-(1→4)-ligadas;
- A estratégia 3 foi a mais eficiente na extração dos polissacarídeos. Nestas condições foi isolado um polissacarídeo do tipo pectina, com unidades de α -D-GalpA-(1→4)-ligadas e cadeias laterais de α -L-Araf-(1→5)-ligadas e β -D-Galp-(1→4)-ligadas. Essas frações também apresentaram altos teores de proteínas. Os resultados das estratégias 2 e 3 indicam que a pectina isolada com temperatura (121 °C), foi parcialmente despolimerizada nas condições da estratégia 2 (pH 2 e 121 °C) gerando a β -galactana descrita acima. Esta condição de extração gerou um polissacarídeo inédito na natureza;
- O tratamento enzimático com pronase E, mostrou-se o método mais efetivo para purificação dos polissacarídeos e eliminação das proteínas sem hidrolisar as moléculas de interesse;
- As estratégias 4 e 5 de quimiotransformação geraram frações com alto teor de carboidratos e baixo teor de proteínas, diferentemente das outras estratégias de extração. As frações da estratégia 4 apresentam alto conteúdo de ácido galacturônico, galactose, xilose, arabinose e ramnose, o que confirma a presença de pectinas. As frações da estratégia 5 apresentam carboidratos com estruturas bastante similares aos obtidos na estratégia 3;
- As frações nativas se diferenciaram significativamente na capacidade de ligação a bactérias enteropatogênicas em relação ao produto comercial BioMos[®]. A fração FS-1d foi a fração de maior destaque, apresentando uma capacidade de ligação 3000% maior que o produto comercial.

- A fração quimiotransformada, EAF-A, e a nativa, EAF-N, apresentaram uma capacidade de ligação semelhante ao produto comercial. Os produtos obtidos a partir destes processos apresentam potencial como substitutos do produto comercial hoje existente, principalmente considerando que a matéria-prima de extração, o farelo de soja, possui alta disponibilidade no Brasil;
- O processo de sonicação, durante o preparo das amostras, mostrou-se de suma importância para a atividade de ligação, uma vez que, ao suprimir esta etapa, as frações apresentaram menor atividade;
- A capacidade de ligação evidenciada para soja, por outros autores, é dita como decorrente da presença de manose nesses extratos e sua respectiva ligação às lectinas da bactéria. No entanto os teores de manose determinados no presente trabalho são baixos (0 – 2,3%) o que pode indicar que as proteínas também possam estar envolvidas no processo de ligação.

REFERÊNCIAS

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. **Complexo Soja – Exportações**. Disponível em: <http://www.abiove.com.br/exporta_br.html>. Acesso em: 15/09/2011.

AGNOL, A. D. **Brasil, o país do agronegócio**. Disponível em: <http://www.aplposcolheita.com.br/biblioteca/seminario_2010/Amelio_Dall_Agnol.pps>. Acesso em: 10/09/2011.

ALMEIDA, L. A. *et al.* **Melhoramento da soja para regiões de baixas latitudes**. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/sojamelhoramento.pdf>>. Acesso em: 05/11/2010.

APROSOJA. Associação dos Produtores de Soja do Estado de Mato Grosso. **Soja na Alimentação**. Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br/novosite/soja.php?tipo=1>>. Acesso em: 10/11/2010.

ASPINALL, G. O. **Chemistry of soyben carbohydrates**. In: Soybean utilization alternatives: A symposium sponsored by The Center for Alternative Crops and Products. St. Paul, MN: The Center for Alternate Crops and Products, p. 117-129, 1988.

ASPINALL, G. O.; COTTRELL, I. W. Polysaccharides of soybeans. VI. Neutral polysaccharides from cotyledon meal. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, p. 1019-1022, 1971.

ASPINALL, G. O. *et al.* Polysaccharides of soy-beans. Part III. Extraction and fractionation of polysaccharides from cotyledon meal. **Journal of the Chemical Society (C)**, v. 5, p. 1065-1070, 1967a.

ASPINALL, G. O. *et al.* Polysaccharides of soy-beans. Part IV. Partial hydrolysis of the acidic polysaccharide complex from cotyledon meal. **Journal of the Chemical Society (C)**, v. 5, p. 1071-1080, 1967b.

ASPINALL, G. O.; HUNT, K; MORRISON, M. Polysaccharides of Soy-beans. Part II. Fractionation of Hull Cell-wall Polysaccharides and the Structure of a Xylan. **Journal of the Chemical Society (C)**, p. 1945-1949, 1966.

ASSUMPÇÃO, L. de C. **Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e o seu potencial biotecnológico**. 93 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**, 1 ed. São Paulo: Edgar Blucher, 1968. p. 100.

ASTEN, A. J. A. M. V.; DJIK, J. E. V. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, p. 251-259, 2005.

BAINY, E. M. *et al.* Varietal differences of carbohydrates in defatted soybean flour and soy protein isolate by-products. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 664-672, 2008.

BEACHEY, E. H. Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 143, n. 3, p. 325-345, 1981.

BECKER, P. M. Achilles heels of enteropathogenic bacteria in livestock. **CIIM**, v. 6, p. 31-54, 2005.

BECKER, P. M. *et al.* Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2686-2696, 2007.

BECKER, P. M.; GALLETTI, S. Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*. **J. Sci. Food Agric.**, v. 88, p. 2026-2035, 2008.

BIGGS, P.; PARSONS, C. M.; FAHEY, G.C. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2327-2336, 2007.

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

BOROWSKY, L. M. **Adição de manooligossacarídeos à dieta como alternativa para o controle da infecção por *Salmonella* sp. Em leitões em fase de creche.**

108p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BURGER, O. *et al.* A high molecular weight constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 29, p. 295-301, 2000.

BUSSIÈRE, J. L. Immunotoxicology of Biological Response Modifiers. In: McQUEEN, C. A. **Comprehensive Toxicology**. 2. ed. v. 5. Washington: Elsevier, 2010. p. 521-529.

CAPEK, P. *et al.* Structural features of an arabinogalactan-protein isolated from instant coffee powder of *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 180-185, 2010.

CARLSON, J. B. Morphology. In: CALDWELL, B.E. (Ed.). **Soybean: production, improvement and uses**. Madison: American Society of Agronomy, 1973 apud MAGALHÃES, G. **Análise da atividade de algumas enzimas antioxidantes em plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) sob níveis de manganês, em função da micorriza arbuscular**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CARUSO, R. **Soja - Uma caminhada sem fim**. Fundação Cargill: Campinas, 1997 apud BORRMANN, D. **Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Setor de Ciências dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CDC. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vitalsigns/FoodSafety/index.html>>. Acesso em: 10/10/2011.

CHEN, H, *et al.* Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1633-1636, 2010.

CIPRIANI, T. R. *et al.* Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, p. 687-690, 2009.

CORNING. **Corning Assay Surfaces: High Binding Polystyrene Surface**. Disponível em:

<http://www.corning.com/lifesciences/latin_america/en/technical_resources/surfaces/assay/high_binding_polystyrene.aspx>. Acesso em: 02/01/2012.

COZZOLINO, R. *et al.* Structural analysis of the polysaccharides from *Echinacea angustifolia* radix. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 263-272, 2006.

DELGOBO, C. L., *et al.* The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 167-175, 1999.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EMBRAPA. **Soja em números (safra 2008/2009)**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29>. Acesso em: 10/10/2011a.

EMBRAPA. **Realidade e perspectivas do Brasil na produção de alimentos e agroenergia, com ênfase na soja**. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/agronegocio_soja.pdf>. Acesso em: 10/10/2011b.

EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja para a região central do Brasil 2003: a importância da soja**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/importancia.htm>>. Acesso em: 10/10/2011c.

EVANS JR, D. J.; EVANS, D. G.; DUPONT, H. J. Hemagglutination Patterns of Enterotoxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* Determined with Human, Bovine, Chicken, and Guinea Pig Erythrocytes in the Presence and Absence of Mannose. **Infection and Immunity**, v. 23, n. 2, p. 336-346, 1979.

FERKET, P. Strategies for finding alternatives to growth promoters. In: Latin American Poultry Congress, XXII, 2011, Buenos Aires. **Artigo Técnico...**Buenos Aires: International business community related to animal production, 2011. Disponível em: <<http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/management/articles/strategies-finding-alternatives-growth-t1771/124-p0.htm>>. Acesso em: 02/1/2012.

FERRARI, R. A.; DEMIATE, I. M. Soybean isoflavones – a shot review. **Biological and Health Sciences**, v. 7, p. 1, p. 39-46, 2001.

FERREIRA, V. F.; SILVA, F. C.; PERRONE, C. C. Sucrose in undergraduate organic chemistry laboratory. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 905-907, 2001

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

FIRON, N. *et al.* Aromatic Alpha-Glycosides of Mannose Are Powerful Inhibitors of the Adherence of Type 1 Fimbriated *Escherichia coli* to Yeast and Intestinal Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 2, p. 472-476, 1987.

FRANSEN, C. T. M. *et al.* Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: Characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 539-547, 2000.

FRONZES, R.; REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. **The EMBO Journal**, v. 27, p. 2271-2280, 2008.

FUKUDA, M. *et al.* Effects of feeding with okara on plasma and liver lipid levels in rats. **J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol**, v. 53, p. 195-199, 2006. **Science Links Japan**. Disponível em: <<http://sciencelinks.jp/j-east/article/200611/000020061106A0317522.php>>. Acesso em: 19/11/2010. Resumo.

FURUTA, H. *et al.* Extraction of water-soluble soybean polysaccharides under acidic conditions. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n. 12, p. 2300-2305, 1998.

GANNER, A. **Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and to modulate cells of the innate immune system**. 106p. Tese (Doutorado) – Divisão de Biotecnologia de alimentos, University of Natural Sources, Viena, 2011.

GANNER, A. *et al.* Quantitative in vitro assay to evaluate the capability of yeast cell wall fractions from *Trichosporon mycotoxinivorans* to selectively bind gram negative pathogens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, p. 168-174, 2010.

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y.; CHEN, P. Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. 59-64, 2006.

GOLLNER, E. M.; BLASCHEK, W.; CLASSEN, B. Structural Investigations on Arabinogalactan-Protein from Wheat, Isolated with Yariv Reagent. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 3621-3626, 2010.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 53, p. 1212-1224, 1975.

GRZYMAJTO, K. *et al.* The high-adhesive properties of the FimH adhesin of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis are determined by a single F118S substitution. **Microbiology**, v. 156, p. 1738-1748, 2010.

GUZMAN-MURILLO, M. A.; ASCENCIO, F. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 473-478, 2000.

HAJATI, H.; REZAEI, M. The Application of Prebiotics in Poultry Production. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 3, p. 298-304, 2010.

HSIAO, H. Y.; ANDERSON, D. M.; DALET, N. M. Levels of β -Mannan in Soybean Meal. **Poultry Science**, v. 85, p. 1430-1432, 2006.

HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 87-95, 1998.

HUISMAN, M. M. H. *et al.* Xyloglucan from soybean (*Glycine max*) meal is composed of XXXG-type building units. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 185-191, 2000.

IBGE. **Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Outubro 2010.** Disponível em: <
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201010_5.shtm>. Acesso em: 11/11/2011.

JIMENEZ-ESCRIG, A. *et al.* Health-Promoting Effects of a Dietary Fiber Concentrate from the Soybean Byproduct Okara in Rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 7495-7501, 2008.

JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008.

JONES, C. H. *et al.* FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 2081-2085, 1995.

KAWAMURA, S.; NARASAKI, T. Study on carbohydrate of soybean: component sugars of fractionated polysaccharides, especially identification of fucose in some hemicelluloses. **Agr. Biol. Chem.**, v. 25, p. 527-531, 1961.

KIERS, J. L. *et al.* Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 35, p. 311-315, 2002.

KIERS, J. L. *et al.* Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 545-552, 2003.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; GROOT, P. W. J. de. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185-202, 2006.

KOGA, T.; KIKUCHI, M. Isolation characterization of a novel immunomodulating fraction from soybeans. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, n. 3, p. 367-371, 1993.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v. 109, p. 161-165, 2007.

LABAVITCH, J. M.; FREEMAN, L. E.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. Purification and characterization of a b-1,4-galactanase which degrades a structural component of the primary cell walls of dicots. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 5904-5910, 1976.

LEUNG, M.Y.K. *et al.* Chemical and Biological Characterization of a Polysaccharide Biological Response Modifier from *Aloe vera* L. *var. chinensis* (Haw.) Berg. **Glycobiology**, v. 14, n. 6, p. 501-510, 2004.

LIAO, H. F. *et al.* Isolation and characterization of an active compound from black soybean [*Glycine max.* (L.) Merr.] and its effect on proliferation and differentiation of human leukemic U397 cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 12, p. 841-846, 2001.

LIAO, H. F.; CHEN, Y. J.; YANG, Y. C. A novel polysaccharide of black soybean promotes myelopoiesis and reconstitutes bone marrow after 5-fluorouracil- and irradiation-induced myelosuppression. **Life sciences**, v. 77, p. 400-413, 2005.

LIMA, L. F. O. de. **Caracterização parcial e avaliação da atividade biológica de exopolissacarídeos produzidos por *Agaricus brasiliensis* e bactéria láctica em fermentação submersa de gêneros isolados e em co-cultivo**. 195p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LINDHORST T. K.; KIEBURG, C.; WENZEL, U. K. Inhibition of the type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli* to erythrocytes by multiantennary a-mannosyl clusters: The effect of multivalency. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, p. 605-613, 1998.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARTÍN, M. J.; MARTÍN-SOSA, S.; HUESO, P. Binding of milk oligosaccharides by several enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from calves. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 5-11, 2002.

MARTÍN-SOSA, S.; MARTÍN, M. J.; HUESO, P. The sialylated fraction of Milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. **J. Nutr.**, v. 132, p. 3067-3072, 2002.

MATSUMOTO, T.; MORIGUCHI, R.; YAMADA, H. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesion induced by hydrochloric acid/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 535-539, 1993.

MATEOS-APARICIO, I. *et al.* Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 245-250, 2010.

MAUGHAN, P. J.; MAROOF, M. A. S.; BUSS, G. R. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). **Molecular Breeding**, v.6, p. 105-111, 2000.

McKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal Epithelial Function: The Case for Immunophysiological Regulation Cells and Mediators (First of Two Parts). **Digestive Diseases and Sciences**, v. 38, n. 8, p. 1377-1387, 1993.

MDIC. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Balança Comercial Brasileira Dados Consolidados**. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl_1298052907.pdf>. Acesso em: 15/11/2011.

MESSINA, M. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 439S-450S, 1999.

MOLIST, F. *et al.* Effect and interaction between wheat bran and zinc oxide on productive performance and intestinal health in post-weaning piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 1592-1600, 2011.

MORAN, C.A. **Nutritional approaches to controlling Salmonella**. Disponível em: <<http://www.pigprogress.net/pigs/disease-management/nutritional-approaches-to-controlling-salmonella-5919.html>>. Acesso em: 15/09/2011.

MORITA, M. Polysaccharides of soybean seeds: Polysaccharide constituents of “hot-water-extract” fraction of soybean seed and an arabinogalactan as its major component. **Agric. Biol. Chem.**, v. 29, p. 564–573, 1965.

NAKAMURA, A. *et al.* Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, n. 10, p. 2249-2258, 2001.

NAKAMURA, A. *et al.* Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soybean soluble polysaccharide. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 5, p. 1155-1158, 2002a.

NAKAMURA, A. *et al.* Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 6, p. 1301-1313, 2002b.

NAKAZATO, G. *et al.* *Lactobacillus Acidophilus* decreases *Salmonella typhimurium* invasion *in vivo* **Journal of Food Safety**, v. 31, p. 284-289, 2011.

NAUGHTON, P. J.; MIKKELSEN, L. L.; JENSEN, B. B. Effects of Nondigestible Oligosaccharides on *Salmonella entérica* Serovar Typhimurium and Nonpathogenic *Escherichia coli* in the Pig Small Intestine *In Vitro*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3391-3395, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NERGARD, C. S. *et al.* Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: Anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.

NEESER, J. R.; KOELLREUTTER, B.; WUERSCH, P. Oligomannoside-type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation of potent inhibitors from plant glycoproteins. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 428-436, 1986.

NEESER, J. R., *et al.* *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. **Glycobiol.**, v. 10, p. 1193-1199, 2000.

NIELSEN, S.S. **Food analysis**. 4. Ed. New York: Springer, 2010.

OFEK, I.; DOYLE, R. J. Common themes in bacterial adhesion. In: OFEK, I.; HASTY, D. L.; DOYLE, R. J. **Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues**. Washington: American Society for Microbiology Press, 2003. p. 513-562.

OFEK, I.; HASTY, D. L.; DOYLE, R. J. **Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues**. Washington: American Society for Microbiology Press, 2003.

OFEK, I.; HASTY, D. L.; SHARON, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, p. 181-191, 2003.

OFEK, I.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. **Nature**, v. 265, p. 623-625, 1977.

OLIVEIRA M. R. R. de. **Avaliação por Rpe de componentes com potencial antioxidante de variedades de soja irradiadas com ⁶⁰CO**. Tese (Doutorado em

Ciências) - Setor de Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas E Nucleares, São Paulo, 2009.

PATON, A. W.; MORONA, R.; PATON, J. C. Designer probiotics for prevention of enteric infections. **Nature**, v. 4, p. 193-200, 2006.

PICHAT, P. **A gestão de resíduos**. Lisboa: Instituto Piaget, 1995 apud RIBEIRO, V. de A. **Aproveitamento do resíduo do extrato de soja na elaboração de um produto tipo paçoca**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PLEWA, M. J. *et al.* Antimutagenic activity of chemical fractions isolated from a commercial soybean processing by-product. **Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis**, v. 19, n. 2, p. 121-135, 1999. **Wiley Online Library**. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291520-6866%281999%2919:2%3C121::AID-TCM5%3E3.0.CO;2-O/abstract>>. Acesso em: 17/11/2010. Resumo.

QUADRI, F. *et al.* Hemagglutinating Properties of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 510-514, 1994.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature**, v. 9, p. 117-128, 2010.

RENARD, C. M. G. C. *et al.* Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 271-280, 1998.

RINAUDO, M. Physicochemical properties of pectins in solution and gel states. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 20-33.

SHARON, N.; OFEK, I. Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. **Glycoconjugate Journal**, v. 17, p. 659-664, 2000.

SIMAS, F. F. **Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de *prunus persica*: caracterização estrutural e análises reológicas**. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SIMAS, F. F. *et al.* Structure of a heteroxylan of gum exudate of the palm *Scheelea phalerata* (uricuri). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2347-2355, 2004.

SIMS, I. M.; FURNEAUX, R. H. Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 423-431, 2003.

SOKURENKO, E. V. *et al.* FimH Family of Type 1 Fimbrial Adhesins: Functional Heterogeneity due to Minor Sequence Variations among *fimH* Genes. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 3, p. 748-755, 1994.

SOKURENKO, E. V.; McMACKIN, V. A.; HASTY, D. L. Bacterial adhesion measured by growth of adhered organisms. **Meth. Enzymol.**, v. 253, p. 519-528, 1995.

SONG, W. O. *et al.* Soy isoflavones as safe functional ingredients. **J. Medicinal Food**, v. 10, n. 4, p. 571-580, 2007.

SPEARMAN, K. R. **Effect of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on the immune status of mares and their foals**. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade da Flórida, Flórida, 2004.

SPRING, P. *et al.* The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 205-211, 2000.

SPRING, P.; PRIVULESCU, M. **Mannan-oligosaccharide: its logical role as a natural feed additive for piglets**. Disponível em: < <http://en.engormix.com/MA-pig-industry/nutrition/articles/mannanoligosaccharide-its-logical-role-t751/141-p0.htm>>. Acesso em: 02/01/2012.

STRÖHER, R. **Hidrólise Enzimática da Proteína do Farelo de Soja**. 74 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Setor de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SVS. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <<http://www.svs.gov.br>>. Acesso em: 17/10/2011.

TAKAHASHI, T. *et al.* Physiological effects of water-soluble soybean fiber in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, n. 8, p. 1340-1345, 1999.

THAKUR, B. R. *et al.* Chemistry and uses of pectin - A review. **Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 47-73, 1997.

TSAI, A. C. *et al.* Effects of soy polysaccharide on gastrointestinal functions, nutrient balance, steroid excretions, glucose tolerance, serum lipids, and other parameters in humans. **The American Journal of clinical nutrition**, v. 38, p. 504-511, 1983.

USDA. United States Department of Agriculture. **Agricultural Statistics**. Disponível em: <http://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2010/2010.pdf>. Acesso em: 17/10/2011.

USOV, A. I.; BILAN, M. I.; SHASHKOV, A. S. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 93-102, 2007.

VESTERLUND, S. *et al.* Measurement of bacterial adhesion - in vitro evaluation of different methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 225-233, 2005.

VRIESMANN, L. C. **Extração, Caracterização e Aspectos Reológicos de Polissacarídeos da Polpa dos Frutos de *Theobroma grandiflorum* (CUPUAÇU)**. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

WAGNER, C.; HENSEL, M. **Adhesive Mechanisms of *Salmonella entérica***. In: Linke, D.; Goldman, A. **Bacterial adhesion - Chemistry, Biology, Physics (Advances in Experimental Medicine and Biology)**. New York: Springer, 2011. p. 17-34.

WANG, X.S.; LIU, L.; FANG, J.N. Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 95-101, 2005.

WEISSMAN, S. J. *et al.* Enterobacterial adhesins and the case for studying SNPs in bactéria. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 115-117, 2003.

WHISTLER, R. L.; SAARNIO, J. Galactomannan from soy bean hulls. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 6055-6057, 1957.

WILSON, J. W. *et al.* Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgrad. Med. J.**, v. 78, p. 216-224, 2002.

WYSMIERSKI, P. T.; VELLO, N. A. **Contribuição genética dos ancestrais da soja às cultivares brasileiras**. Resumo apresentado no 56º Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá, 2010.

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

YAMAGUCHI, F.; OTA, Y.; HATANAKA, C. Extraction and purification of pectic polysaccharides from soybean *okara* and enzymatic analysis of their structures. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, p. 265-273, 1996.

ZERI, A. C. M. *et al.* Análise do teor de proteínas e carboidratos em produtos de origem vegetal por RMN de ^{13}C . **Embrapa-CNPDIA**, n. 5, p. 1-4, 1996.

ZHOU, J. R. *et al.* Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1628-1635, 1999.