

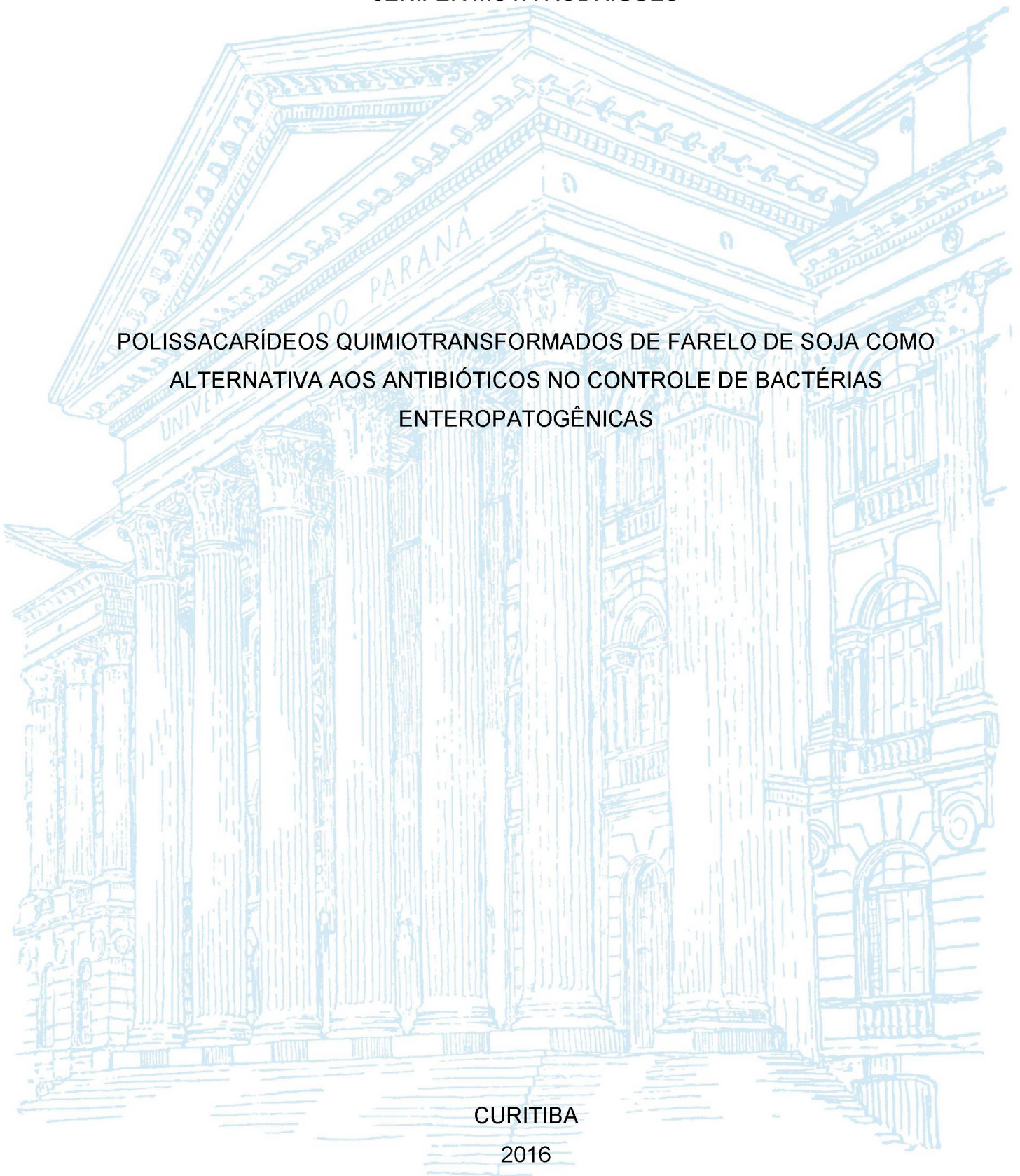
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JENIFER MOTA RODRIGUES

POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DE FARELO DE SOJA COMO
ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS NO CONTROLE DE BACTÉRIAS
ENTEROPATOGÊNICAS

CURITIBA

2016



JENIFER MOTA RODRIGUES

POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DE FARELO DE SOJA COMO
ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS NO CONTROLE DE BACTÉRIAS
ENTEROPATOGÊNICAS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Eugênia Duarte Nosedá

CURITIBA

2016

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

R696p

Rodrigues, Jenifer Mota

Polissacarídeos quimiotransformados de farelo de soja como alternativa aos antibióticos no controle de bactérias enteropatogênicas [recurso eletrônico] / Jenifer Mota Rodrigues. – Curitiba, 2016.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2016.

Orientador: Miguel Daniel Nosedá. Coorientador: Maria Eugênia Duarte Nosedá.

1. Polissacarídeos. 2. Enterobactérias. 3. Antibióticos. 4. Soja. 5. Bactérias. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nosedá, Miguel Daniel. III. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. IV. Título.

CDD: 572.566

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

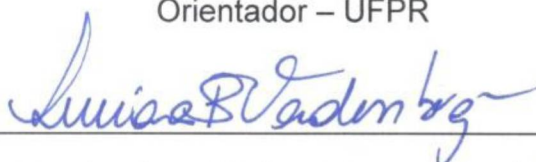
JENIFER MOTA RODRIGUES

“POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DE FARELO DE SOJA
COMO ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS NO CONTROLE DE BACTÉRIAS
ENTEROPATOGÊNICAS”.

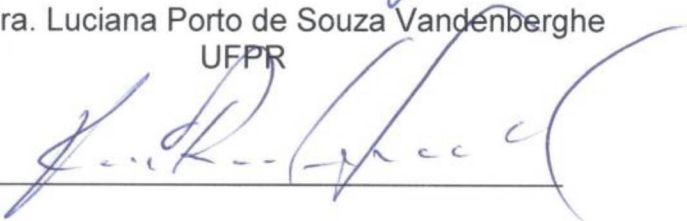
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



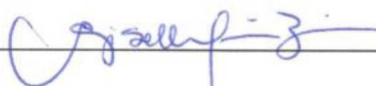
Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Orientador – UFPR



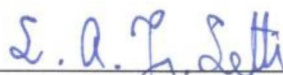
Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe
UFPR



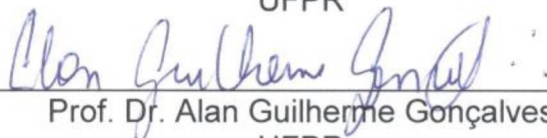
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
UFPR



Profa. Dra. Gisella Maria Zanin
UEM



Prof. Dr. Luiz Alberto Junior Letti
UFPR



Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves
UFPR

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2016.

Ao Robson, meu companheiro, por todo amor, compreensão, paciência e apoio incondicional, dispendo enorme vezes do seu tempo e acreditando na concretização de mais esse passo.

AGRADECIMENTOS

Ao iniciar a escrita desse tópico, a primeira coisa que me vem em mente é que mais uma etapa está se findando, mesmo com tanto por fazer ainda ou com o tanto que gostaria de ter feito. Findar uma etapa para mim não significa apenas começar algo novo, mas sim levar a bagagem adquirida a um novo desafio.

É difícil chegar ao fim de um caminho sozinho. São muitas as pessoas envolvidas, e arrisco a dizer que grande parte delas sequer tem conhecimento de sua real participação. Assim gostaria de agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que colaboraram, que incentivaram, que torceram por mim. Bem sei que cometerei o ato falho de escolher quem mencionar aqui, pois corro o risco de cometer injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram.

Acredito que orientar alguém é muitas vezes como atirar no escuro, precisa se ter fé e acreditar no potencial que existe atrás de meia dúzia de palavras e expressões. É pegar pela mão e mostrar o caminho, de resto espera-se que o orientando vá por si só. Às vezes é preciso redirecionar o orientando perdido, mas sempre na esperança de que ele chegue lá...e o lá depende muito mais dele do que de você. Espero ter conseguido chegar lá, já foram 6 anos nesse caminho, às vezes tudo ficava meio obscuro, mas espero ter sempre ficado dentro das expectativas, pois não teria alcançado nada se a 6 anos atrás você não tivesse tido fé em mim, e acreditado que eu poderia, acreditado muitas vezes mais que do eu mesma. Obrigado por muitas vezes fazer eu sentir que minha opinião tinha valor, por respeitar meus momentos ruins, por colaborar em inúmeros instantes para que estivéssemos aqui nesse momento. Ao meu orientador, Miguel, muito obrigada!

À professora Maria Eugênia pela confiança e perspicácia em inúmeros momentos ao longo desses anos. Seu lado objetivo me faz lembrar a mim mesma! E logicamente obrigada por todo aprendizado, pelos conselhos e conversas.

Ao Robson. Ainda não existe nenhuma palavra grandiosa o suficiente para expressar a eterna gratidão que sinto por tê-lo por perto em todos os momentos. Uma vez li que nem tudo que é escrito é próprio para se dedicar a alguém. No entanto, diante de todos os esforços, me parece no mínimo razoável essa minha atitude. Seja por tantas horas dedicadas em idas ao laboratório, seja de noite, finais de semana, feriados, só para me dar o prazer da sua companhia e segurança. Pelos infinitos “helps” furando parede do laboratório, instalando prateleiras ou coisas

similares, passando massa corrida no teto ou então pintando a coluna de alumínio da sala das bactérias só porque eu cismeiei que tinha que ser tudo branco. Pelas ajudas com a internet, ou então com as inúmeras horas corrigindo longos textos em inglês ou vendo minha apresentação umas mil vezes. Por acordar cedo para fazer um café para eu levar para a qualificação ou simplesmente por me acalmar naquele dia em que tudo deu errado. É incrível como participar de um trabalho não significa necessariamente ajudar arduamente no laboratório, vai muito além disso, e você sabe bem do que estou falando. A você só me resta dizer um muito obrigada por ser a pessoa mais incrível, e por me permitir fazer parte dos seus dias também!! Amo você!

À minha família, em especial minha mãe e minha vó. Minha mãe por acreditar infinitamente que eu sou capaz de realizar qualquer coisa e sempre ficar na torcida para que eu não tropece em nada. Minha vó, que muitas vezes vê coragem em mim quando eu mesma não consigo enxergar, que ora por mim em todos os momentos. Aos meus irmãos, tão diferentes de mim, mas que mesmo de longe ficam na torcida para que tudo corra bem. Aos meus demais familiares por brindarem minhas vitórias e sempre mandarem vibrações positivas.

Não tem como não citar a família que pude escolher: meus amigos. Carlos, Cris e Any, amigos de sempre, sei que por muitas vezes falhei com vocês, mas embora não acreditem 100%, fazer doutorado dá muito trabalho. Teve horas que precisei abdicar de certas coisas, infelizmente em alguns momentos a abdicção foram nossos encontros. Ale, Marcela, Cassi e Mari vocês adoçam e abrilhantam minha vida com seus sorrisos. A distância não é páreo para nossa amizade! Lou e Ju Teodoro, sinto saudades dos tempos em que os dias eram leves por suas companhias diárias. Agora nossos encontros são distantes e pesados, afinal só nos reunimos para comer...e muito...hehehehe!

Durante todos esses anos de laboratório muitas pessoas passaram. Com todas aprendi alguma coisa, mas houve aquelas que gostaria de levar para sempre. Tati Winkler, amiga, comadre...sei que por trás dessa teimosia existe uma pessoa doce e sensível. Sem sua presença durante todos esses anos, teria sido tudo mais difícil, sinto falta da sua companhia. Fran, embora você duvide, é impossível te conhecer e não se inspirar. Sua disciplina e organização fazem de você uma profissional sem igual. Além disso, você é uma amiga ímpar, nossas horas infinitas de conversas fazem tudo parecer mais fluido e fácil de carregar. Ester, uma das

peças de maior coração que já conheci. Às vezes meio teimosa e bravinha, mas sei que no fundo é extremamente amável! Shay, é inegável o poder do seu sorriso. Estar ao seu lado significa dar, no mínimo, muitas risadas! Talvez esse seja um dos motivos de eu ir lá te dar bom dia todos os dias e já ficar por lá proseando um pouco! Tati Milani, só vou repetir o que já lhe falei, melhor amiga-mãe que você, vai ser difícil encontrar.

À Elaine, por todas as conversas, momentos de descontração, compartilhamento de angústias, pelo carinho e preocupação em todos os momentos.

Aos demais colegas e amigos de laboratório, obrigada pela convivência agradável, auxílios no dia-a-dia, momentos de descontração e conversas. Em especial ao pessoal do lab. 248, Amanda, Bárbara, Mieke, Liria, André, Rafael e Diego, sem dúvida um povo animado. Cada um com seu jeito, cada um com seu momento. Embora eu fique pegando no pé pela organização do laboratório, não tenho dúvidas que vocês são um ótimo time. À Amanda um agradecimento especial por todas as infinitas discussões a respeito de planejamento experimental, compras e orçamentos, é bom poder dividir isso com você!

Às alunas de Iniciação Científica, Ana Bárbara e Marcela que me permitiram aprender mais um pouco sobre o ato de ensinar. Espero que as experiências de vocês tenham sido produtivas.

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

À Bio-4 por gentilmente ceder o material utilizado nesse trabalho.

Aos professores Luciana e Letti pelas contribuições durante a etapa de qualificação.

Ao professor Wagner Bonat do Departamento de Estatística, sem dúvida a análise dos resultados não seria a mesma sem sua ajuda.

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

À Rosane pelas análises de CLG-EM.

Ao Angelo pelas análises de termogravimetria.

Ao pessoal do Centro de RMN pelas análises de ressonância.

Aos cursos de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e à Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica.

À CAPES, CNPQ e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que eu não citei, porém torcem pela minha conquista, fica o meu reconhecimento e gratidão!

OBRIGADA!!!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O presente trabalho objetivou caracterizar a estrutura química fina dos polissacarídeos quimiotransformados de farelo de soja, e avaliar suas capacidades de ligação e inibição da adesão *in vitro* a bactérias enteropatogênicas. Para tanto, uma solução de farelo de soja ($150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) teve seu pH ajustado para 2,0 e foi submetida a um tratamento térmico (120°C , 1 atm, 1 h). Após filtração, neutralização e centrifugação, o sobrenadante obtido foi submetido a um novo processo térmico (120°C , 1 atm, 15 min). A solução final foi então tratada com TCA e em seguida os polissacarídeos foram precipitados com etanol. Esta fração polissacarídica foi fracionada e submetida a análises químicas e espectroscópicas para determinação da estrutura química. Adicionalmente, as frações foram avaliadas *in vitro* quanto à capacidade de adesão à *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, usando um produto comercial e BSA como controles positivo e negativo, respectivamente. Estes resultados foram analisados estatisticamente pelo programa R usando uma equação sigmoideal que descreve a cinética de crescimento bacteriano. A fração bruta (FS-Ep) apresenta alto teor de carboidratos (85,0%) e baixo teor de proteínas (4,7%). As demais frações obtidas (FS-R, FS-Tp, FS-A e FS-Es) apresentaram elevados teores de proteínas (39,1 – 86,8%) e menores teores de carboidratos (8,7 – 37,2%). Todas as frações apresentaram galactose, arabinose e ácido urônico como monossacarídeos principais. O fracionamento de FS-Ep permitiu a identificação de dois grupos de moléculas: um primeiro grupo de alta massa molar ($M_w \cong 500 \text{ kDa}$), composto de pectinas parcialmente despolimerizadas, com unidades de $\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow\text{4)}$ -ligadas e cadeias laterais de $\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow\text{5)}$ -ligadas e $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}$ -ligadas; e um segundo grupo composto por uma $\beta\text{-D-galactana (1}\rightarrow\text{4)}$ -ligada de baixa massa molar ($M_w \cong 8 \text{ kDa}$). Com exceção da fração composta por pectinas purificadas, todas as demais frações apresentaram capacidade de aderir a enterobactérias, apresentando resultados estatisticamente equivalentes ao produto comercial, mostrando-se como potenciais substitutos. Os resultados indicam que a presença de manose não é o único fator responsável pela ligação da bactéria às moléculas de interesse, outros fatores/biomoléculas participam do processo de adesão. Delineamento experimental do tipo DCCR permitiu otimização das condições de extração do farelo de soja em função do rendimento do processo e obtenção de extratos com alta capacidade de adesão a enterobactérias. Os rendimentos dos extratos brutos foram elevados em 10x, passando de 7,9% (extrato bruto FS-A, antes da otimização) para 77,3% (extrato CS). Os melhores rendimentos (53,9 e 77,3%) e extratos com maiores atividades de adesão a enterobactérias (219,9 e 215,8% em relação ao controle positivo) foram obtidos em pH 0,5, 60 min e [farelo] de $300 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 13,0, 60 min e [farelo] de $300 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Análises indicam a presença de proteínas e carboidratos nos extratos biologicamente ativos. Adicionalmente, resultados demonstram que os extratos de farelo de soja mantêm atividade após processo de digestão, bem como apresentam potencial de inibir a adesão de enterobactérias a receptores análogos conhecidos. Todos os resultados em conjunto demonstram o potencial econômico e biotecnológico dos extratos quimiotransformados de farelo de soja na prevenção de infecções causadas por enterobactérias, e uma das consequências esperadas de sua utilização pode ser a redução do uso de antibióticos na pecuária.

Palavras-chave: Resistência a antibióticos. Enterobactérias. Adesão bacteriana. Receptores Análogos. Farelo de Soja. Polissacarídeos.

ABSTRACT

This study aimed to characterize the fine chemical structure of chemotransformed polysaccharides from soybean meal and evaluate their binding capacity and inhibition of adhesion *in vitro* to enteropathogenic bacteria. For this purpose, a soybean meal solution (150 g·L⁻¹) had its pH adjusted to 2.0 and was subjected to a heat treatment (120°C, 1 atm, 1 h). After filtration, neutralization and centrifugation, the supernatant obtained was subjected to a new thermal process (120°C, 1 atm, 15 min). The final solution was then treated with TCA and then the polysaccharides were precipitated with ethanol. This polysaccharide fraction was fractionated and subjected to chemical and spectroscopic analysis to determine the chemical structure. In addition, the fractions were evaluated *in vitro* for their ability to adhere to *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, using a commercial product and BSA as positive and negative control, respectively. The results were statistically analyzed in the R software following a sigmoidal equation that describes the kinetics of bacterial growth. Crude fraction (FS-Ep) had a high carbohydrate content (85.0%) and low protein content (4.7%). The remaining fractions obtained (FS-R, FS-Tp, FS-A and FS-Es) had elevated protein levels (39.1 to 86.8%) and lower carbohydrate content (8.7 to 37.2%). All fractions showed galactose, arabinose and uronic acid as main monosaccharides. The FS-Ep fractionation allowed the identification of two groups of molecules: a first group of high molecular weight ($M_w \cong 500$ kDa), composed of partially depolymerized pectins, with units α -D-GalpA-(1→4)-linked units as main chain and (1→5)-linked- α -L-Araf and (1→4)-linked- β -D-Galp side chains; and a second group composed of a β -D-Galactan (1→4)-linked of low molar mass ($M_w \cong 8$ kDa). Except for the fraction consisting of purified pectins, all other fractions showed ability to adhere to the enterobacteria, with statistically equivalent results to the commercial product, showing up as potential replacements. The results indicate that the presence of mannose is not the only factor responsible for the binding of the bacteria to the molecules of interest, other factors/biomolecules participate in the adhesion process. Experimental design, type CCRD, allowed optimization of the soybean meal extraction conditions on the yield of the process and obtain extracts with high capacity of adherence to the enterobacteria. The yields of the crude extracts were high at 10x, going from 7.9% (crude extract FS-A, before optimization) to 77.3% (CS extract). The best yields (53.9 and 77.3%) and extracts with activity greater adhesion to the enterobacteria (219.9 and 215.8% compared to the positive control) were obtained at pH 0.5, 60 min and [meal] 300 g·L⁻¹ and pH 13.0, 60 min, [meal] 300 g·L⁻¹. Analyzes indicate the presence of protein and carbohydrates in biologically active extracts. Furthermore, results demonstrate that soy meal extracts retain activity after digestion process and have the potential to inhibit the adhesion of enterobacteria to known analogue receptors. All the results together demonstrate economic and biotechnological potential of the chemotransformed extracts from soybean meal in preventing infections caused by enterobacteria, and as an expected consequence of their use may be to reduce the use of antibiotics in livestock.

Key words: Antibiotics Resistance. Enterobacteria. Bacterial adhesion. Analogue Receptors. Soybean Meal. Polysaccharides.

LISTA DE FIGURAS

FIGURE 1.1 - NORMAL ADHESION MECHANISM	48
FIGURA 2.1 - MODELO DE ESTRUTURA DA ARABINOGALACTANA TIPO I ISOLADA DE FARELO DE SOJA.....	122
FIGURA 2.2 - MODELO DE ESTRUTURA QUÍMICA DO SSPS	123
FIGURA 2.3 - ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA OS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE SOJA PRETA, (A) GLUCANA LINEAR, (B) ARABINOGALACTANA DO TIPO II.....	124
FIGURA 2.4 - XILOGLUCANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO ALCALINA DE FARELO DE SOJA.....	125
FIGURA 2.5 - ESTRUTURA DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DA CASCA DA SOJA.....	125
FIGURA 2.6 - FLUXOGRAMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA	130
FIGURA 2.7 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES FS-A, FS-Ep E FS-Es.....	141
FIGURA 2.8 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES FS-Ep E FS-Es....	142
FIGURA 2.9 - ESPECTRO DE RMN CP/MAS ¹³ C DA FRAÇÃO FS-Tp.....	143
FIGURA 2.10 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC-MALLS/RID DA FRAÇÃO FS-Ep	144
FIGURA 2.11 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO FS-Ep EM SEPHAROSE 6B (ELUENTE: H ₂ O)	145
FIGURA 2.12 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (GPC-RALLS/RID) DA FRAÇÃO FS-EpB.....	147
FIGURA 2.13 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS/RID) DA FRAÇÃO FS-EpA.....	147
FIGURA 2.14 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO FS-Ep POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO	148
FIGURA 2.15 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO FS-EpA EM SEPHAROSE 6B (ELUENTE: NaCl 1 M)...	149
FIGURA 2.16 - PERFIL DE ELUIÇÃO HPSEC-MALLS/RID DA FRAÇÃO FS-EpA E SUBFRAÇÕES (A); FRAÇÕES HOMOGÊNEAS F2, F3 E F4 (B).149	
FIGURA 2.17 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA A FRAÇÃO F3 APÓS HIDRÓLISE TOTAL. EM DESTAQUE REGIÃO CORRESPONDENTE À GalA	151
FIGURA 2.18 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO F2.....	152
FIGURA 2.19 - (A) RMN DE ¹ H DAS SUBFRAÇÕES F1-F5; (B) AMPLIAÇÃO DE SINAIS DA REGIÃO α-ANOMÉRICA DA FRAÇÃO F4	154
FIGURA 2.20 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO F2.....	155

FIGURA 2.21 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO FS-EpB. NO DETALHE: SINAL INVERTIDO NO EXPERIMENTO DE ^{13}C -DEPT-135.....	157
FIGURA 2.22 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FS-EpB. NO DETALHE: AMPLIAÇÃO DE SINAIS DA REGIÃO α -ANOMÉRICA	158
FIGURA 2.23 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO FS-EpB.....	160
FIGURA 2.24 - ESPECTRO DE RMN DE COSY DA FRAÇÃO FS-EpB.....	160
FIGURA 2.25 - ESPECTRO DE RMN DE TOCSY DA FRAÇÃO FS-EpB.....	161
FIGURA 3.1 - FLUXOGRAMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA	180
FIGURA 3.2 - ESQUEMA GERAL PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	183
FIGURA 3.3 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE CAPACIDADE DE ADESÃO <i>IN VITRO</i>	186
FIGURA 4.1 - FLUXOGRAMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA	213
FIGURA 4.2 - FLUXOGRAMA GERAL PARA DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	217
FIGURA 4.3 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ADESÃO <i>IN VITRO</i>	220
FIGURA 4.4 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	223
FIGURA 4.5 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO PARA A VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1) EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO (A),(B) E pH E CONCENTRAÇÃO DO SOLUTO (C),(D).....	232
FIGURA 4.6 - CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS TESTADOS EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (A) E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO (B)	234
FIGURA 4.7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO PARA A VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2) EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO (A), (B) E pH E CONCENTRAÇÃO (C), (D).....	239
FIGURA 4.8 - FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FARELO DE SOJA SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO	243
FIGURA 4.9 - CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS TESTADOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO.....	246
FIGURA 4.10 - ENSAIO DE CITOXICIDADE PARA AS FRAÇÕES CS (A) E CSr (B)	251
FIGURA 4.11 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES BSr, CSr E DSr	256
FIGURA 4.12 - ESPECTROS DE RMN CP/MAS ^{13}C DAS FRAÇÕES ARd, BRd, CRd, DRd, CELULOSE PADRÃO E AMOSTRA RICA EM PROTEÍNA (FS-Tp)	258

FIGURA 4.13 - CURVAS DE TG (A, C, E) E DTG (B, D, F) PARA OS RESÍDUOS (A, B), SOBRENADANTES (C, D) E ELUÍDOS DA DIÁLISE (E, F)	260
FIGURA 4.14 - CURVAS DE TG E DTG PARA AS FRAÇÕES BRd (A), BSr (B) E BSe (C)	261
FIGURA 4.15 - CURVAS DE TG E DTG PARA AS FRAÇÕES CRd (A), CSr (B), CSe (C), DRd (D), DSr (E) E DSe (F)	264
FIGURA 4.16 - CURVAS DE TG E DTG PARA A FRAÇÃO FS-Tp	278
FIGURA 4.17 - CURVAS DE TG E DTG PARA UMA PECTINA (FRAÇÃO FS-EpA), OBTIDA APÓS CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO	278

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 3.1 - CURVAS DE CRESCIMENTO: TEMPO-DEPENDENTE DE APARECIMENTO DE <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium ATCC 14028: LOG (DENSIDADE CELULAR INICIAL)	189
GRÁFICO 3.2 - CORRELAÇÃO ENTRE DENSIDADE CELULAR INICIAL E PARÂMETROS DE CRESCIMENTO A E C	190
GRÁFICO 3.3 - CORRELAÇÃO ENTRE DENSIDADE CELULAR INICIAL E PARÂMETROS DE CRESCIMENTO B , t_{pi} , t_{det} E $t_{OD=0,1}$	191
GRÁFICO 3.4 - REGRESSÃO LINEAR PARA <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium ATCC 14028	192
GRÁFICO 3.5 - CURVAS DE ADESÃO DE <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium ATCC 14028 EM MICROPLACAS REVESTIDA COM AS AMOSTRAS.....	193
GRÁFICO 4.1 - DIAGRAMA DE PARETO PARA A VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1)	226
GRÁFICO 4.2 - VALORES EXPERIMENTAIS OBSERVADOS EM FUNÇÃO DOS VALORES PREDITOS PARA A VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1) ..	230
GRÁFICO 4.3 - DIAGRAMA DE PARETO PARA A VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)	235
GRÁFICO 4.4 - VALORES EXPERIMENTAIS OBSERVADOS EM FUNÇÃO DOS VALORES PREDITOS PARA A VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)	238
GRÁFICO 4.5 - REGIÃO ÓTIMA IDENTIFICADA PELA SOBREPOSIÇÃO DOS GRÁFICOS DE CONTOURNO DAS DUAS VARIÁVEIS RESPOSTAS: RENDIMENTO (Y_1) E CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)	240
GRÁFICO 4.6 - CAPACIDADE DE ADESÃO DAS FRAÇÕES CS E CSr EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	247
GRÁFICO 4.7 - INIBIÇÃO DA ADESÃO DE ENTEROBACTÉRIAS A MANANAS ADERIDAS EM MICROPLACAS	249

LISTA DE TABELAS

TABLE 1.1-	CARBOHYDRATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS.....	103
TABLE 1.2 -	GLYCOCONJUGATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS.....	107
TABLE 1.3 -	PATENTS CLAIMING MOLECULES WITH POTENTIAL PATHOGEN INHIBITION.....	111
TABELA 2.1 -	COMPOSIÇÃO APROXIMADA DO GRÃO DE SOJA.....	117
TABELA 2.2 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS.....	139
TABELA 2.3 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO BRUTA FS-Ep.....	146
TABELA 2.4 -	MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M _w) CALCULADA PARA AS FRAÇÕES.....	150
TABELA 2.5 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO FS-EpA.....	151
TABELA 2.6 -	ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA FRAÇÃO FS-EpA.....	156
TABELA 2.7 -	ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA FRAÇÃO FS-EpB.....	162
TABELA 2.8 -	ANÁLISE DE METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO FS-EpB.....	162
TABELA 3.1 -	PARÂMETROS DE CRESCIMENTO PARA <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium ATCC 14028 EM MICROPLACAS REVESTIDAS COM EXTRATOS DE FARELO DE SOJA.....	194
TABELA 3.2 -	ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS.....	196
TABELA 4.1 -	NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADOS NO DCCR.....	214
TABELA 4.2 -	MATRIZ DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESPOSTAS OBSERVADAS DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES.....	224
TABELA 4.3 -	ANÁLISE DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A VARIÁVEL RENDIMENTO (Y ₁).....	226
TABELA 4.4 -	COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL COMPLETO - VARIÁVEL RENDIMENTO DO EXTRATO (Y ₁).....	228
TABELA 4.5 -	COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL REDUZIDO - VARIÁVEL RENDIMENTO DO EXTRATO (Y ₁).....	228

TABELA 4.6 - ANOVA PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL REDUZIDO - VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1)	229
TABELA 4.7 - ANÁLISE DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)	235
TABELA 4.8 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL COMPLETO - VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2).....	236
TABELA 4.9 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL REDUZIDO - VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2).....	237
TABELA 4.10 - ANOVA PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL REDUZIDO - VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2).....	238
TABELA 4.11 - VALORES EXPERIMENTAIS E PREDITOS DAS RESPOSTAS SOB CONDIÇÕES DE PROCESSO OTIMIZADAS	241
TABELA 4.12 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO	244
TABELA 4.13 - CAPACIDADE DE ADESÃO DAS FRAÇÕES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO.....	245
TABELA 4.14 - CAPACIDADE DE ADESÃO DA ADESÃO DAS FRAÇÕES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	247
TABELA 4.15 - POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DAS FRAÇÕES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO.....	249
TABELA 4.16 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES APÓS DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> DAS FRAÇÕES CS E CSr.....	253
TABELA 4.17 - CAPACIDADE DE ADESÃO DAS FRAÇÕES CS E CSr APÓS DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	254
TABELA 4.18 - ANÁLISES QUÍMICAS DOS SOBRENADANTES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO.....	255
TABELA 4.19 - ESTIMATIVA DE CONSUMO ENERGÉTICO DOS PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA	266
TABELA 4.20 - ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA PRODUÇÃO DE 1 kg DE EXTRATO DE FARELO DE SOJA, UTILIZANDO A CONDIÇÃO OTIMIZADA C*	267

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A; B; C; D - Extratos Aquosos obtido em pH 0,5; 1,3; 13 e 13,25 (DCCR)
AGP - Animals Growth Promoter
AR; BR; CR; DR - Resíduo das Extrações (DCCR)
ARd; BRd; CRd; DRd - Resíduo dialisados das Extrações (DCCR)
AS; BS; CS; DS - Sobrenadantes das Extrações (DCCR)
ASe; BSe; CSe; DSe - Eluídos dos sobrenadantes dialisados das Extrações (DCCR)
ASr; BSr; CSr; DSr - Sobrenadantes dialisados das Extrações (DCCR)
Ara - Arabinose
ATCC - American Type Culture Collection
AU - Ácido urônico
BHI - Brain Heart Infusion
BSA - Albumina de Soro Bovino
C+ - Controle Positivo
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CDC - Center for Disease Control
CLG-EM - Cromatografia Líquida-Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
COSY - Correlation Spectroscopy
CP/MAS - Cross Polarization with Magic Angle Spinning
CS-FI; CSr-FI - Fibras insolúveis obtidas após digestão *in vitro* das frações CS e CSr
CS-FS; CSr-FS - Fibras solúveis obtidas após digestão *in vitro* das frações CS e CSr
CS-MD; CSr-MD - Material digerido obtidos após digestão *in vitro* das frações CS e CSr
DAEC - Diffusely Adherent *E. coli*
DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional
DEPT - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
 dn/dc - Variação do Índice de Refração em Relação à Concentração
DP - Desvio Padrão
DTG - Primeira derivada de TG
EAA - European Economic Area
EAEC - Enteroggregative *E. coli*
ECDC - European Center for Disease Prevention and Control
EFSA - European Food Safety Authority

EHEC - Enterohaemorrhagic *E. coli*
EIEC - Enteroinvasive *E. coli*
EPEC - Enteropathogenic *E. coli*
ETEC - Enterotoxinogenic *E. coli*
EU - European Union
FDA - Food and Drug Administration
FS-A - Extrato Aquoso
FS-Tp - Fração insolúvel obtida após tratamento de FS-A com TCA 80% (m/v)
FS-Es - Fração do sobrenadante etanólico
FS-Ep - Fração do precipitado etanólico
FS-EpA; FS-EpB - Frações eluídas com água destilada durante o fracionamento cromatográfico da fração FS-Ep em Sepharose 6B
F1; F2; F3; F4; F4; F5; F6; F7 e F8 - Fração eluída com NaCl 1 M durante o fracionamento cromatográfico da fração FS-EpA em Sepharose 6B
FS-R - Resíduo retido em tecido fino após processo de filtração
Fuc - Fucose
FS - Farelo de Soja
Gal - Galactose
GalA - Ácido galacturônico
Glc - Glucose
GPC - Cromatografia de Permeação em Gel
HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy
HPSEC - Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão
LALLS - Low Angle Laser Light Scattering
MALLS - Multiangle Laser Light Scattering
Man - Manose
MOS - Manoligossacarídeos
M_w - Massa Molecular Ponderal Média
MRSA - Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus*
MRS - Metodologia de Superfície de Resposta
OD - Densidade Óptica
PBS - Tampão Fosfato De Sódio
PPT - Precipitado
PTN - Proteínas

RALLS - Right Angle Laser Light Scattering

Rha - Ramnose

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RID - Índice de refração diferencial

SOB - Sobrenadante

TCA - Ácido Tricloroacético

TFA - Ácido Trifluoracético

TG - Termogravimetria

TOCSY - Total Correlation Spectroscopy

$t_{OD=0,1}$ - Tempo de detecção no qual OD em 690 nm atinge valor de 0,1

TSB - Tryptic Soy Broth

VTEC - Verotoxinogenic *E. coli*

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

US - United States Xil - Xilose

X₁ - Variável Independente pH

X₂ - Variável Independente Tempo (min)

X₃ - Variável Independente Concentração do Farelo de Soja (g·L⁻¹)

Y₁ - Resposta Rendimento

Y₂ - Resposta Capacidade de Adesão a Enterobactérias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	25
1.1	OBJETIVOS	26
1.1.1	Objetivo Geral.....	26
1.1.2	Objetivos Específicos	26
1.2	JUSTIFICATIVA	27
1.3	ESTRUTURA DA TESE	28
	CAPÍTULO 1 - CARBOHYDRATES AND GLYCOCONJUGATES USE IN ENTEROPATHOGEN CONTROL AND PREVENTION OF BACTERIAL RESISTANCE – REVIEW PAPER.....	30
1.1	ABSTRACT	31
1.2	INTRODUCTION	31
1.3	BACTERIA RESISTANCE IN FOODBORNE ANIMALS	34
1.3.1	Emergence of Bacterial Resistance – Source and Mechanisms	34
1.3.2	Transfer of Antibiotics Resistance among Animals and Humans	36
1.3.3	Zoonosis.....	38
1.3.4	Antibiotic Use in Food-Production Animals.....	40
1.3.5	Banned Antibiotic Growth Promoters.....	43
1.3.6	Estimate Antibiotic Use for Food-Producing Animals	44
1.4	NEED FOR ALTERNATIVES TO REPLACE ANTIBIOTICS	45
1.4.1	Use of Analogue Receptors.....	47
1.5	CARBOHYDRATES AND GLYCOCONJUGATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS AND ACT as ALTERNATIVE TO ANTIBIOTICS	50
1.5.1	Alternatives to Control <i>Campylobacter</i>	50
1.5.2	Alternatives to Control <i>Salmonella</i>	52
1.5.3	Alternatives to Control <i>Escherichia</i>	54
1.5.4	Alternatives to Control Other Pathogens	63
1.6	CONCLUSIONS	65
	REFERENCES	66
	APPENDIX 1	103
	APPENDIX 2	107
	APPENDIX 3	111
	CAPÍTULO 2 - EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DE FARELO DE SOJA.....	114

2.1	INTRODUÇÃO	115
2.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	116
2.2.1	Soja	116
2.2.1.1	A Soja e a Economia	116
2.2.1.2	Composição da Soja	116
2.2.1.3	Usos da Soja	118
2.2.2	Farelo de Soja	119
2.2.3	Polissacarídeos de Soja	120
2.2.4	Atividades Biológicas de Polissacarídeos de Soja	125
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	129
2.3.1	Material.....	129
2.3.2	Processo de Extração	129
2.3.3	Métodos Analíticos Gerais para Caracterização dos Extratos Brutos e das Frações Purificadas.....	130
2.3.3.1	Métodos Colorimétricos.....	130
2.3.3.1.1	Dosagem de Açúcares Totais	130
2.3.3.1.2	Dosagem de Proteínas.....	131
2.3.3.1.3	Dosagem de Ácidos Urônicos	131
2.3.3.2	Determinação da Rotação Óptica.....	131
2.3.3.3	Determinação da Composição Monossacarídica	132
2.3.3.4	Análise de Metilação	132
2.3.3.5	Métodos Cromatográficos	133
2.3.3.5.1	Cromatografia de Exclusão	133
2.3.3.5.2	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	133
2.3.3.5.3	Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CLG-EM)	134
2.3.3.5.4	Cromatografia Líquida de Permeação em Gel ou Exclusão Estérica.....	134
2.3.3.5.4.1	Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão acoplada a detector de Índice de Refração Diferencial e Espalhamento de Luz em Multiângulos (HPSEC-MALLS/RID)	135
2.3.3.5.4.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) acoplada aos detectores de índice de Refração Diferencial (RID) e de espalhamento de luz à 7° (LALLS) e 90° (RALLS)	135
2.3.3.6	Métodos Espectroscópicos.....	136
2.3.3.6.1	Ressonância Magnética Nuclear Monodimensional (¹ H, ¹³ C, DEPT-135) e Bidimensional (HSQC, COSY e TOCSY).....	136
2.3.3.6.2	Ressonância Magnética Nuclear de Estado Sólido	136

2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	138
2.4.1	Extração e Obtenção dos Polissacarídeos.....	138
2.4.2	Análises Químicas e de Composição Monossacarídica.....	138
2.4.3	Análises de Ressonância Magnética Nuclear.....	141
2.4.4	Análise por HPSEC-MALLS-RID.....	144
2.4.5	Fracionamento da fração FS-Ep.....	145
2.4.6	Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Metilação.....	152
2.5	CONCLUSÕES.....	164
	REFERÊNCIAS.....	165
CAPÍTULO 3 - CAPACIDADE DE ADESÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA À <i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium.....		
3.1	INTRODUÇÃO.....	178
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	180
3.2.1	Processo de Extração.....	180
3.2.2	Ensaio para Determinação da Capacidade de Adesão a Enterobactérias <i>in vitro</i>	180
3.2.2.1	Princípio.....	180
3.2.2.2	Parâmetros de Crescimento.....	181
3.2.2.3	Inóculo e Condições de Cultura.....	182
3.2.2.4	Curva de Calibração.....	183
3.2.2.5	Ensaio de Capacidade de Adesão.....	183
3.2.2.6	Tratamento dos Dados e Estatística.....	185
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	187
3.3.1	Ensaio de Capacidade de Adesão.....	187
3.3.2	Curva de Calibração e Parâmetros de Crescimento.....	188
3.3.3	Determinação da Capacidade de Adesão dos Extratos obtidos de Farelo de Soja.....	192
3.3.4	Mecanismos de Adesão.....	197
3.4	CONCLUSÕES.....	201
	REFERÊNCIAS.....	202
CAPÍTULO 4 - OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE FARELO DE SOJA COM ALTA CAPACIDADE DE ADESÃO A ENTEROBACTÉRIAS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS FRAÇÕES OTIMIZADAS.....		
4.1	INTRODUÇÃO.....	211
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	213
4.2.1	Processo de Extração.....	213

4.2.2	Delineamento Experimental e Análises Estatísticas.....	213
4.2.2	Caracterização dos Extratos Brutos e Frações Purificadas.....	215
4.2.2.1	Métodos Colorimétricos.....	215
4.2.2.2	Métodos Espectroscópicos.....	216
4.2.2.3	Análises Térmicas – Termogravimetria (TG).....	216
4.2.3	Ensaio de digestão <i>in vitro</i>	216
4.2.4	Ensaio para Determinação da Capacidade de Adesão e Inibição da Adesão a Enterobactérias <i>in vitro</i>	218
4.2.4.1	Inóculo e Condições de Cultura	218
4.2.4.2	Curva de Calibração.....	218
4.2.4.3	Parâmetros de Crescimento.....	218
4.2.4.4	Ensaio de Capacidade de Adesão	218
4.2.5.5	Ensaio de Inibição de Adesão Utilizando Microplacas Revestidas Previamente com Mananas.....	219
4.2.5.6	Tratamento dos Dados e Estatística.....	221
4.2.5.7	Ensaio de citotoxicidade	222
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	224
4.3.1	Efeito do pH, Tempo e Concentração do Farelo de Soja sobre o Rendimento da Extração.....	225
4.3.2	Efeito do pH, Tempo e Concentração do Farelo de Soja sobre a Capacidade de Adesão dos Extratos a Enterobactérias	233
4.3.3	Otimização Gráfica e Validação dos Modelos de Regressão.....	240
4.3.4	Análise dos Extratos Obtidos após Otimização do Processo.....	242
4.3.4.1	Potencial de Inibição da Adesão <i>in vitro</i> e Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos de Farelo de Soja sobre <i>Salmonella</i> spp.....	248
4.3.4.2	Digestão <i>in vitro</i>	251
4.3.4.3	Análises Químicas e de Ressonância Magnética Nuclear	254
4.3.4.4	Análises Termogravimétricas	259
4.3.5	Análise Prévia de Viabilidade Econômica do Processo de Obtenção de Extratos Bioativos de Farelo de Soja	265
4.4	CONCLUSÕES	268
	REFERÊNCIAS.....	270
	APÊNDICE 1	278
2.	CONCLUSÃO GERAL.....	279
3.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	281
	REFERÊNCIAS GERAIS	282

1 INTRODUÇÃO GERAL

As infecções entéricas são hoje uma das causas globais de morbidade e mortalidade, atingindo mundialmente milhões de pessoas/ano. Entre os enteropatógenos de maior importância e interesse estão espécies de *Campylobacter* e *Salmonella*, causas frequentes de gastroenterites humanas.

Estas bactérias propagam-se de animais para seres humanos principalmente via cadeia alimentar, refletindo que, além de um problema de saúde humana, as doenças entéricas são um dos maiores problemas na pecuária. O uso de antibióticos, na pecuária, tem tido nas últimas décadas a finalidade de controlar patógenos intestinais (reduzir mortalidade) e promover a performance ou saúde animal. No entanto, seu uso generalizado em animais produtores de alimentos tem contribuído para a seleção de diferentes cepas de bactérias resistentes em todo o mundo. Dessa forma, existe grande necessidade de criação de métodos alternativos de defesa contra doenças causadas por bactérias zoonóticas.

Entre as estratégias terapêuticas já propostas como alternativas ao uso de antibióticos e controle da resistência bacteriana estão a utilização de certos tipos de carboidratos e glicoconjugados. Essas moléculas aderem aos patógenos, impedindo a colonização do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, inibindo seu efeito patogênico. Contudo, são limitadas as informações sobre sacarídeos e suas fontes de obtenção, acessibilidade, concentração e possíveis estruturas envolvidas no processo de adesão bacteriana. Mais estudos são requeridos para elucidar tais informações e identificar o mecanismo de efeito anti-adesão dessas moléculas sobre enterobactérias.

Polissacarídeos de diversas origens (OFEK; HASTY; SHARON, 2003) já foram relatados como agentes anti-adesão de enterobactérias, entre eles polissacarídeos derivados de soja (NEESER; KOELLREUTTER; WUERSCH, 1986; NEESER; WURSCH, 1990; KIERS et al., 2002; KIERS et al., 2003; BECKER et al., 2007; BECKER; GALLETI, 2008; RODRIGUES, 2012; NOSEDA et al., 2012).

A soja é um grão bastante versátil utilizado pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Seu principal destino é a extração de óleo, cujo processo gera grandes quantidades de farelo de soja, um subproduto de alto valor nutricional, baixo custo direcionado principalmente a fabricação de rações animais.

Dentro dessa perspectiva, buscam-se novas moléculas, obtidas a partir de farelo de soja, capazes de impedir a ligação de enterobactérias à mucosa intestinal, podendo, desta forma, se tornar uma alternativa ao uso de antibióticos e atuar como substitutos aos produtos comerciais que já apresentam esse apelo biológico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar a estrutura química fina dos polissacarídeos quimiotransformados de farelo de soja, e avaliar suas capacidades de ligação e inibição da adesão *in vitro* a bactérias enteropatogênicas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos modificados quimicamente (quimiotransformados) de farelo de soja;
- Determinar, por métodos químicos e espectroscópicos, a composição e estrutura química dos extratos quimiotransformados obtidos;
- Isolar e purificar polissacarídeos quimiotransformados a partir de farelo de soja;
- Determinar, por métodos químicos e espectroscópicos, a estrutura química fina dos polissacarídeos quimiotransformados;
- Avaliar a estabilidade *in vitro* dos extratos quimiotransformados frente a condições similares às encontradas no estômago e intestino de animais monogástricos (digestão *in vitro*);
- Determinar a capacidade de adesão *in vitro* dos extratos brutos, extratos após digestão *in vitro* e polissacarídeos purificados;
- Comparar a capacidade de adesão *in vitro* entre os extratos/polissacarídeos testados;
- Determinar *in vitro* a capacidade dos extratos brutos em inibir a adesão de *Salmonella* spp. a mananas;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos sobre *Salmonella* spp.;

- Determinar a concentração mínima para atividade de adesão dos extratos brutos;
- Otimizar processo de produção dos extratos quimiotransformados de farelo de soja, tendo como respostas rendimento do processo e capacidade de adesão a enterobactérias;
- Validar o processo de otimização de produção dos extratos quimiotransformados de farelo de soja;
- Determinar, por métodos químicos, espectroscópicos e termogravimétricos, a composição dos extratos otimizados de farelo de soja;
- Correlacionar a composição/estrutura dos extratos/frações com a capacidade de adesão a enterobactérias;
- Realizar análise econômica preliminar da produção de extratos bioativos de farelo de soja.

1.2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é mundialmente o segundo maior produtor de soja. O principal uso da soja é na produção de óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Esse processo gera elevadas quantidades de farelo de soja. O farelo representa em torno de 70% da semente de soja, portanto, a cada tonelada de grão que é destinada para extração de óleo, 700 kg de farelo de soja são gerados. A previsão para a safra 2015/2016 é de que sejam produzidos no Brasil 30 milhões de toneladas de farelo de soja. A maior parte desse farelo é destinada à produção de ração animal. Sua composição nutricional inclui alto teor de proteínas e carboidratos, indicando ser uma fonte com potencial de utilização para fins biotecnológicos. Pesquisas e processos têm sido desenvolvidos utilizando subprodutos de soja, com o intuito de obter produtos refinados com maior valor agregado.

Existem poucos estudos científicos sobre a atividade biológica de polissacarídeos obtidos do farelo de soja. A pesquisa por novas moléculas bioativas produzidas a partir do farelo de soja torna-se de alta relevância, uma vez que permite o conhecimento de novas fontes com potencial biológico provenientes de um subproduto de baixo custo e alta disponibilidade no Brasil.

A resistência a antibióticos é um dos grandes problemas do mundo globalizado do século XXI. Buscas constantes são realizadas com o intuito de se encontrar substituintes que apresentem eficácia similar sem ocasionar as mesmas consequências. Sacarídeos e glicoconjugados de diversas fontes têm sido descritos como produtos alternativos, no entanto, incerteza a respeito das estruturas químicas ideais persistem e o mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido.

Estudo anterior, realizado no laboratório de Química de Carboidratos da UFPR, indicou que extratos brutos de farelo de soja apresentam potencial de adesão à *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (NOSEDA et al., 2012; RODRIGUES, 2012). Esses extratos eram compostos por β -galactanas-(1 \rightarrow 4)-ligadas e pectinas. Entretanto, mais estudos ainda são necessários para viabilização do processo de produção desses extratos de farelo de soja e identificação das moléculas responsáveis pela atividade biológica.

Sendo assim, busca-se no presente trabalho estudar polissacarídeos quimiotransformados obtidos de farelo de soja, quanto à sua estrutura química fina e capacidade de adesão às bactérias enteropatogênicas.

1.3 ESTRUTURA DA TESE

Com o intuito de facilitar a leitura deste documento, a tese está dividida em quatro capítulos distintos.

No **primeiro capítulo** foram compiladas informações sobre resistência bacteriana em animais destinados à alimentação e exemplos da utilização de sacarídeos e glicoconjugados, obtidos a partir de diferentes fontes, no controle de doenças de origem alimentar, causada por agentes gram-negativos. O capítulo foi escrito em formato de artigo, em inglês, para submissão futura no Journal Biotechnology Advances.

No **segundo capítulo** estão compilados os resultados relacionados à extração, isolamento e purificação de polissacarídeos quimiotransformados de farelo de soja, bem como a composição química dos extratos brutos e estrutura química fina dos polissacarídeos purificados.

No **terceiro capítulo** estão agrupados os resultados obtidos nos ensaios de capacidade de adesão a enterobactérias realizados com os extratos brutos e

polissacarídeos purificados, caracterizados previamente no capítulo anterior, e considerações a respeito da relação estrutura-atividade.

No **quarto capítulo**, foram reunidos os resultados referentes à otimização do processo de extração de farelo de soja, para obtenção de melhores rendimentos e extratos com alta capacidade de adesão a enterobactérias, aplicando um Delineamento Composto Central Rotacional. Adicionalmente, estão compilados os resultados referentes aos ensaios de digestão *in vitro*, inibição da adesão e citotoxicidade realizados com as frações extraídas nas condições ótimas de processo.

CAPÍTULO 1

CARBOHYDRATES AND GLYCOCONJUGATES USE IN ENTEROPATHOGEN CONTROL AND PREVENTION OF BACTERIAL RESISTANCE – REVIEW PAPER

1.1 ABSTRACT

The widespread use of antibiotics in food-producing animals has contributed to the emergence of different strains of resistant bacteria around the world. These resistant bacteria can spread from animals to humans via the food chain, or other less common pathways. This transfer implies often in failed treatments, generating serious public health problems. Thus, alternatives to antibiotics are urgently needed.

Among the main therapeutic strategies already proposed for the control of bacterial resistance is the use of carbohydrates or glycoconjugates. These molecules have been extensively reported in the literature as analogue receptors, i.e., they mimic natural receptors involved in the adhesion process of the pathogen to host tissue. The great advantage of this strategy is the fact that analogue receptors prevent the infection without bactericidal action, minimizing the selective pressure that causes resistance.

This review compiles information about the use of antibiotics in food-producing animals and its consequences, and thoroughly reports extensive research involving the use of carbohydrates and glycoconjugates in controlling foodborne illness, with particular focus on gram-negative pathogens.

Key-words: antibiotic resistance; analogue receptors; adhesion; enteropathogen; carbohydrates; glycoconjugates.

1.2 INTRODUCTION

Antibiotics, one of the greatest discoveries of the 20th century, are culminating in a major concern of the 21st century, the bacteria resistance (GUZMAN-MURILLO; ASCENCIO, 2000; HEILIG; LEE; BRESLOW, 2002; AARESTRUP, 2005; ANDERSSON; HUGHES, 2011; SEAL et al., 2013). The “magic bullets”, described by Paul Ehrlich, which were once lifesaver are now worthless and in the near approaching future, may have ceased its use (BOSCH; ROSICH, 2008; HUTTNER et al., 2013; THE LANCET INFECTIOUS, 2013; WOOLHOUSE; FARRAR, 2014).

Bacteria resistance is a health care problem worldwide (WITTE, 2013) recognized by leading global health organizations (MARSHALL; LEVY, 2011) that

requires global solutions (HOWARD et al., 2013; LAXMINARAYAN et al., 2013) for responsible utilization. Different causes of resistance are described, for example, inappropriate and excess use of antibiotics for nonbacterial infections such as viral infections or colds (DOWELL; SCHWARTZ; PHILLIPS, 1998; MARSHALL; LEVY, 2011; PERSELL et al., 2013) and extensive use for animal farming and agricultural purposes, mainly as growth promoter in animals (AGP) (SALISBURY et al., 2002; MARTINEZ, 2009).

It is estimated that 20 tons of antibiotics are produced every hour in the world (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014), reaching up to 200,000 tons per year (WISE, 2002). Approximately 50-70% of all antibiotics produced are intended for food producing animals (MELLON, BENBROOK; BENBROOK, 2001; BUSH et al., 2011; DANTAS; SOMMER, 2014). Substantial portions of these are used for the nontherapeutic purposes of growth promotion (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; SMITH et al., 2002).

Substantial controversy exists about the impact of agricultural antibiotic use on the subsequent emergence of antibiotic-resistant bacteria in humans. Animal food products are contaminated with antibiotic-resistant bacteria, mainly gram negatives, generated by antibiotic usage as growth promoters or for treatment or control of animal diseases (SMITH et al., 2002). It has been reported that annually 48 million people contract a foodborne illness in the United States (CDC, 2014b). In severe cases, use of antibiotics may be required in the treatment of foodborne illness, making antibiotic resistance in foodborne pathogens a considerable concern (MATHEW et al., 2007).

It is already enormous the economic and human cost of antibiotic resistance (BUSH et al., 2011). For instance, there were 386,000 infections cases by multidrug-resistant bacteria, and 25,000 attributable deaths, in European Union (EU), Iceland and Norway in 2007, two-thirds being due to gram-negative bacteria, most responsible for foodborne illness (ECDC/EMEA, 2009; TILLOTSON, 2013). A recent report by the United States (US) Centers for Disease Control and Prevention estimated that antibiotic-resistant pathogens cause at least 2 million illnesses and 23,000 deaths each year in the US (CDC, 2014a). Antibiotic-resistant infections lead to a cost of \$20 billion per year in excess direct healthcare in the US (ROBERTS et al., 2009). In Europe, these extra costs were estimated in €1.5 billion each year,

being €870 million with antibiotic-resistant gram-negative bacteria (ECDC/EMEA, 2009).

As antibiotics are losing effectiveness due to the increase in the number of resistant bacteria, the discovery of new therapeutic agents with novel modes of action becomes urgent and crucial (CHOPRA et al., 2008; OLDFIELD; FENG, 2014). However, there is a gap in antibiotics pipeline, as just four new classes of antibiotics were launched in the past 40 years, none to treat gram-negative bacteria (TALBOT et al., 2006; COATES, HALLS; HU, 2011; COOPER; SHLAES, 2011; CAIN, 2012; BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2013). The cost of bringing a new antibiotic to market is estimated among US\$ 800 million to 1.7 billion and demands about 15 years of research (IDSA, 2004; VICENTE et al., 2006; BERDY, 2012). The cost and time consumed, combined with the poor return of the investment, makes pharmaceutical industries reluctant to pursue antibiotic research (LEEB, 2004; NORRBY; NORD; FINCH, 2005; COOPER; SHLAES, 2011). These companies are focusing investments on more lucrative areas, such as debilitating or chronic illnesses and mood disorders, which need treatments used for over years or a lifetime, rather than for just a week or two as the antibiotics (LEEB, 2004; ALANIS, 2005; CHOPRA et al., 2008).

Given this complex situation, the search for novel therapeutic strategies to replace antibiotics has been intense (COX; WRIGHT, 2013). However, the true efficacy remains unclear because the present results are often inconsistent (GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; ALLEN et al., 2013). These approaches commonly include the use of pre-, pro- and symbiotics, antibacterial vaccines, phage therapy, herbs, plant extracts and etheric oils, exogenous enzymes and organic acids.

Often mistakenly, carbohydrates or glycoconjugates are categorized as prebiotic, however their functions may be not related to the growth of beneficial bacterial populations (GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010). Mannanligosaccharides (MOS), widely marketed, may act as inhibitors of bacterial adhesion, functioning as a mimetic or analogue receptor. These saccharides bind to adhesins, e.g. mannose-specific lectin, of gram-negative pathogens that express Type-1 fimbriae, such as *Salmonella* and *E. coli*, resulting in their excretion from the intestine (OFEK; MIRELMAN; SHARON, 1977; LINDHORST; KIEBURG; KRALLMANN-WENZEL, 1998; SPRING et al., 2000). Similarly, other molecules of

the same class may act as analogue receptors for different types of bacteria adhesins. In this context, this review compiles information about bacterial resistance in food-producing animals, and report examples of the use of saccharides and glycoconjugates, obtained from different sources, as analogue receptors in the control of foodborne illness, caused by gram-negative pathogens.

1.3 BACTERIA RESISTANCE IN FOODBORNE ANIMALS

1.3.1 Emergence of Bacterial Resistance – Source and Mechanisms

The antibiotics' history began in 1929 with the discovery of penicillin by Alexander Fleming (FLEMING, 1929). Years later, in 1936, Gerhard Domagk discovered the first sulfonamide drugs (or sulfa drugs) in a synthetic dye, the Prontosil (CONGRESS, 1995; STORK, 2005). Later, René Dubos, in 1939, found gramicidin, an antibacterial agent which inhibits the growth of gram positive (DUBOS, 1939A; B; DUBOS; CATTANEO, 1939). In 1940, researchers Ernst Chain and Howard Florey gave sequence to Fleming studies (CHAIN et al., 1940). They purified penicillin and showed the compound could be used to treat infections in animals. During World War II, large scale penicillin production was implemented (GUSTAFSON; BOWEN, 1997), and since then, antibiotics have been widely used for a variety of purposes, particularly infectious disease control (DAVIES; SPIEGELMAN; YIM, 2006). Amid the dawn of the antibiotic era, the danger of creating resistant bacteria was clear (LEVY, 2014), and alerting the increase in resistant bacteria are not new. Fleming in his acceptance speech of the Nobel Prize warned of the development of bacterial resistance (FLEMING, 1945).

However, the origin of antibiotic resistance is controversial and continues to divide opinions. Some researchers defend the idea of bacterial resistance as a modern phenomenon, facilitated by selective pressure of millions of tons of antibiotics used since its introduction, on sensitive strains, favoring the survival of resistant strains (MITSUHASHI, 1993; VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; ARASON et al., 2002; LEVY; MARSHALL, 2004; DAVIES; DAVIES, 2010; HUTTNER et al., 2013; LAXMINARAYAN et al., 2013). Other researchers argue that bacterial resistance is an ancient and natural phenomenon (HUGHES; DATTA, 1983; BARLOW; HALL, 2002; BHULLAR et al., 2012; COX; WRIGHT, 2013; RODRÍGUEZ-

ROJAS et al., 2013), already existing for two billion years (Hall; Barlow, 2004). They claim inconsistency in the arguments of bacterial resistance as a contemporary emergency. Antibiotics would select only resistant determinants already pre-existing (COSTA et al., 2011).

Leaving aside the temporal origin of bacterial resistance (pre or post antibiotic era), antibiotic resistance exists in two different phenotypes: intrinsic and acquired. Intrinsic resistance is a common evolutionary phenotype to all members of a specific taxonomic group of bacteria (genus, species, and subspecies), regardless of previous exposure to antibiotics and not obtained from horizontal gene transfer (HGT) (FAJARDO et al., 2008). This resistance is directly related with the structural or functional characteristics inherent to the native microorganism (SALISBURY et al., 2002; BOERLIN; WHITE, 2013). Conventional examples refer to resistant phenotypes displayed by gram-negative bacteria that are intrinsically resistant to many classes of antibiotics effective against gram-positive bacteria (COX; WRIGHT, 2013). Triclosan biocide is broadly effective against gram-positive bacteria, however it is unable to inhibit the growth of members of the gram-negative genus *Pseudomonas* (BLAIR et al., 2015). This drug, in susceptible species, hinders fatty acid synthesis by inhibition of enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase, however, this genus carries a *fabV* gene, that encodes triclosan-resistant enoyl-ACP reductase isozyme (FabV), culminating in the absence of a susceptible target (ZHU et al., 2010).

In addition to intrinsic resistance, bacteria can acquire or develop resistance to antibiotics. This acquired resistance occurs when normally susceptible organisms develop resistance through genetic alterations (by mutations in chromosomal genes) or horizontal acquisition of new genes carried by mobile genetic material (plasmids, transposons, integrons, bacteriophages and naked DNA) (MAZEL; DAVIES, 1999; HOGAN; KOLTER, 2002; SALISBURY et al., 2002; MARTINEZ, BAQUERO; ANDERSSON, 2007; BOERLIN; WHITE, 2013). When associated with mobile genetic elements, the acquisition of resistance determinants may occur between bacteria of the same species or different species and genus by transduction (DNA transfer by a bacteriophage); conjugation (mobilization of DNA through inter-organism contact); transformation (naked DNA incorporation released from another microorganism); or transposition (DNA mobilization into the organism's genome)

(DAVISON, 1999; DZIDIC; BEDEKOVIC, 2003; ROE; PILLAI, 2003; LEVY; MARSHALL, 2004; WRIGHT, 2007).

These resistant phenotypes are expressed by several antibiotic resistance mechanisms. Such mechanisms can be divided into four major groups: (1) reduced in cell permeability, decreasing diffusion of antibiotics into the cell (NIKAIDO, 1994; DÉ et al., 2001; MCDERMOTT; WHITE, 2011); (2) change in efflux pumps that extrude the drug from the interior cell to the external environment (LEVY, 1992; NIKAIDO, 1996; WEBBER; PIDDOCK, 2003); (3) inactivation of the drug due to degradation or structural modification, either before or after penetrating the cell (ALEKSHUN; LEVY, 2004; WRIGHT, 2005); and (4) modification and protection of target sites that may reduce the affinity of the antibiotic to the target (LAMBERT, 2005; BLAIR et al., 2015). Different mechanisms can, alone or together, confer resistance to one antibiotic, a class of antibiotics, a group of classes of related antibiotics or even to antibiotics of several different classes resulting in multidrug resistance (BOERLIN; WHITE, 2013).

1.3.2 Transfer of Antibiotics Resistance among Animals and Humans

The effectiveness of any antibiotic is compromised by the potential development of tolerance or resistance from its initial use (DAVIES; DAVIES, 2010). The use of antibiotics, therefore, impose a natural selection (BAQUERO et al., 1998; WITTE, 2000), generating many reservoirs of resistant strains (ALLEN, 2014).

Resistance genes and resistant bacteria flows constantly between different environments (SINGER et al., 2003). Thus, the transmission interface between humans and animals is complex due to the numerous possible transmission routes, and frequent transfer of genes between different species of bacteria (KRUSE; SØRUM, 1994; OKEKE; EDELMAN, 2001; WEGENER, 2012). Therefore, concrete evidence of dissemination and routes of spread between humans and animals are difficult to obtain (MARSHALL; LEVY, 2011; LAXMINARAYAN et al., 2013), however, several studies have been published demonstrating indirect evidence of this transmission.

Bezanson, Khakhria and Bollegraaf (1983) identified, from a hospital outbreak in newborns, in Canada, resistant strains of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium coming from dairy cattle, possibly transmitted by raw milk. An outbreak,

in Denmark, involving the same *Salmonella* species was investigated by Mølbak et al. (1999). The studies found that such strains were resistant to quinolones. A total of eleven people was hospitalized and two died. Molecular epidemiology indicated that the primary source of contamination was a swine herd. Hoelzer et al. (2010) isolated in human multidrug resistant strains of *Salmonella enterica* serotypes Newport and Typhimurium. Epidemiological results identified cattle dairy farms as a source of transmission.

Lee (2003) studied cattle, pigs and chicken's isolates, collected between 2001 and 2003. Strains of methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were identified. To determine the genetic relationship between animals and human's isolates, during the entire period of the study, human samples were collected. Molecular studies have shown that the genome of six animal MRSA isolate were very closely related to those of some human MRSA isolates, indicating that the source of contamination arises possibly through contaminated food intake. In Denmark, two cases of MRSA were also researched and linked to a livestock reservoir (HARRISON et al., 2013). Phylogenetic analyzes of isolated human and animal support zoonotic transmission probability.

While the majority of studies on the epidemiology of antibiotic susceptibility has focused animals as primary sources of transmission of resistance antibiotics, some studies have shown that transmission between animals and humans can occur bilaterally (SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001), making it difficult to quantify and identify the responsibility of each part involved (SINGER et al., 2003; COLLIGNON; ANGULO, 2006). Seguin et al. (1999) followed for 13 months, horses that attended a veterinary hospital and developed post-infection procedures performed on site. MRSA strains were isolated; however, such strains are very uncommon animal isolates and common human isolates. Thus, samples of people associated with equine surgery and recovery were collected in an attempt to identify a possible source of the organisms. Results indicated that the isolates originated from a common source, and it is speculated that the hospital staff were the primary source of infection, although the specific mode of transmission is not clear. O'mahony et al. (2005) reported similar observations. MRSA strains identified in animals may have had its origin human hospitals.

The spread between the different hosts can occur by direct contact, through the environment or via the food chain (PENDERS et al., 2013; CANTAS; SUER,

2014). In the new host, the bacteria can colonize and infect, transmit their resistance genes to different bacteria (commensal and pathogenic), besides to accept resistance genes from other bacteria (SALYERS; GUPTA; WANG, 2004). There is a direct relationship between the number of resistant bacteria and the potential spread and transmission. The greater the number of resistant bacteria, the higher the probability of transmission to potentially pathogenic bacteria and to the environment (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; O'BRIEN, 2002). Thus, the subject resistance in zoonotic pathogens deserves attention. The increased prevalence among animals increases the spread to humans. Therefore, it is necessary an application of an antibiotic management system by the veterinary medicine and animal husbandry to prevent or minimize the emergence and spread of antibiotic resistance in the sector (LAXMINARAYAN et al., 2013).

1.3.3 Zoonosis

Zoonosis are diseases and infections that can be naturally transmitted by animals to humans (PAHO, 2001; ALEMAYEHU, 2012). The most common zoonosis are foodborne infections caused by the presence of zoonotic bacteria of genera *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Listeria* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in production animals (AARESTRUP; WEGENER, 1999; BLANCOU et al., 2005).

The gastrointestinal tract of animals serves as a reservoir of zoonotic agents (POOLE et al., 2004), and foodborne infections come from direct contact with the animal or contamination through the food chain (ANGULO; NUNNERY; BAIR, 2004; WEGENER, 2012; STANTON, 2013). Food contamination can happen at any stage of the production chain, including slaughtering (fecal contamination), milking and other subsequent processes (COLLINS; WALL, 2004; GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; HUE et al., 2010). Other forms of contamination, less frequent, may also occur, by water or vegetables grown in soils fertilized with contaminated excrement or irrigated with contaminated water (TEUBER, 2001; HANNING; NUTT; RICKE, 2009; EFSA, 2014).

There is considerable debate surrounding the use of antibiotics in livestock and the risks of its use for human health. This is due, mainly, to the direct correlation between antibiotics use and frequency of resistant genes in food animals (AUSTIN; KRISTINSSON; ANDERSON, 1999; BRUINSMA et al., 2003; CHANTZIARAS et al.,

2014). Inappropriate and excessive use of antibiotics contributes to the emergence of resistance in zoonotic pathogens (PERRETEN et al., 1997; BERENDS et al., 2001; ANDERSON et al., 2003; FORSLUND et al., 2013).

Among the zoonotic bacteria of greater importance and concern are species of *Campylobacter* and *Salmonella*, frequent cause of human gastroenteritis (THORNS, 2000; NEWELL et al., 2010; BEHRAVESH; WILLIAMS; TAUXE, 2012). It is estimated, all around the world, a total of 94 million cases of nontyphoidal *Salmonella* infections per year resulting in approximately 155 thousand deaths (WHO, 2014). A report recently issued by the European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA/ECDC), on the occurrence of foodborne illness in the European Union (EU) in 2013, indicated 214,779 and 82,694 confirmed cases of campylobacteriosis and salmonellosis, respectively, covering approximately 95% of total disease (EFSA/ECDC, 2015b). In the same year, it was reported in 10 US sites (approximately 15% of the US population), 17,856 confirmed cases of foodborne illness, being 7,277 and 6,621 cases of salmonellosis and campylobacteriosis cases, respectively, corresponding to 78% of total cases (CRIM et al, 2014). The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimate that across the US occur each year around 1.3 million *Campylobacter* infections and 1.2 million nontyphoidal *Salmonella* infections (CDC, 2014a). These data show the alarming rate at which infections caused by zoonotic bacteria are growing.

Resistant zoonotic bacteria have been extensively identified worldwide (ENGBERG et al., 2001; GEBREYES; ALTIER, 2002; ENGBERG et al., 2004; CANTÓN et al., 2008; HAWKEY, 2008; GESER et al., 2011; MATHER et al., 2013; SCHMID et al., 2013; VERNET et al., 2014; WHO, 2014; SHAIKH et al., 2015). Treatment options for some of the most common foodborne infections have decreased, because isolates from antibiotic-resistant bacteria continue to emerge. That was the conclusion published by EFSA at the beginning of 2015, after analysis of the data reported by 28 Member States for the year 2013 (EFSA, 2015).

Official data released by the report issued by EFSA/ECDC, show that *Salmonella* strains resistant to commonly used antibiotics were isolated from humans, animals (mainly turkeys and broiler) and meat products (EFSA/ECDC, 2015a). Multidrug resistance rates were high, 31.8% in humans, 56% in broiler, 73% in turkeys and 37.9% in pigs. In human's isolates, high proportions of strains resistant

to ampicillin, sulfonamides and tetracyclines were observed. Low rates of resistant strains to third-generation cephalosporins and non-susceptible to fluoroquinolones were also found. In animal's isolates (turkeys and broiler meat), strains with high resistance to fluoroquinolones were observed. The results for *Campylobacter* also worry. Resistant strains were isolated from humans, animals (mainly broiler, pigs and cattle) and broiler meat. For the specie, *Campylobacter jejuni*, more than half of the isolates in humans and broiler are resistant (54.6% and 54.5%, respectively), alongside 35.8% in cattle. For the specie, *Campylobacter coli* numbers are even higher, 66.6% in humans, 68.8% in broiler and 31.1% in pigs. In human's isolates, high proportions of strains resistant to ciprofloxacin, tetracyclines and fluoroquinolones, and low to moderate proportions to erythromycin were observed. In animals isolates extremely high levels of resistance to ciprofloxacin, nalidixic acid and tetracyclines were observed.

Estimates made by the CDC indicate that approximately 24% and 8% of all cases of campylobacteriosis and salmonellosis, in US, are caused by resistant strains (CDC, 2014a). Most of the identified *Campylobacter* strains are resistant to ciprofloxacin, and a minority to azithromycin. Most of the identified *Salmonella* strains are multidrug resistant (five or more antibiotic classes), and some were resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin.

Thus, resistance in zoonotic bacteria poses a threat to human health, as it can be propagated and easily disseminated through the food chain, besides often causing failure of antibiotic treatment (SALISBURY et al., 2002; ZHAO et al., 2005; MELLATA, 2013). Furthermore, there is a significant impact on public health worldwide, since food animals and foods of animal origin are traded worldwide (AARESTRUP; WEGENER; COLLIGNON, 2008; CAVACO; AARESTRUP, 2013).

1.3.4 Antibiotic Use in Food-Production Animals

Antibiotics are widely used in food-production animals. In some countries, the amount of antibiotics, for the livestock reaches up to four-times the amount used in human medicine (FDA, 2012; 2014a). The reasons for the use of antibiotics in food-producing animals are diverse. Modern intensive livestock operations, with high population density, allows the rapid spread of pathogens, requiring aggressive management strategies, which often include the use of antibiotics therapy (Landers

et al., 2012). Among the main indications are the treatment and prevention of enteric diseases and respiratory disorders in young animals, mastitis and skin and organs abscesses (TEUBER, 2001; CASAL et al., 2007). Thus, the use of these antibiotics allows the growth of more healthy and productive animals, with lower incidence of diseases, ensuring animal welfare and leading to reduced morbidity and mortality (PAGE, 2006; OLIVER; MURINDA; JAYARAO, 2011).

Antibiotics are used in four different ways, including prevention (prophylaxis), control (metaphylaxis), treatment of diseases (therapeutic use) and promoting growth and improves feed efficiency (use as a growth promoter) (MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002; WEGENER, 2003; MARSHALL; LEVY, 2011). The therapeutic use is defined as treating infections in clinically sick animals (PHILLIPS et al., 2004). The treatment involves individual animals, for a short period at doses of antibiotics that exceed the minimum inhibitory concentration of the target pathogen (BARTON, 2000).

The metaphylaxis and prophylaxis settings are similar and often overlap. Metaphylaxis is the treatment of a group of animals immediately after the appearance of first clinical symptoms in some animals, thus infections are treated before they become clinically visible (SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001; SINGER et al., 2003; AARESTRUP, 2005; MATHEW; CISELL; LIAMTHONG, 2007). The same authors define prophylaxis as the treatment of healthy animals, used as a preventive measure to the emergence of disease. Doses involved in treatments are moderate to high, usually applied by water or feed, for a predefined period to a group of animals (GUSTAFSON; BOWEN, 1997; GRAHAM; BOLAND; SILBERGELD, 2007). It is important to remark that prophylaxis requires caution since the appropriate duration of therapy is not well defined (GIGUÈRE; ABRAMS-OGG; KRUTH, 2013).

Use the promotion of growth includes continued usage of antibiotics in animal feed, in order to promote growth and increase efficiency of feed conversion (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; VIOLA; DEVINCENT, 2006). Antibiotics used for this purpose are commonly called antibiotic growth promoters (AGP). AGPs are included in the formulation of *feed, in non-therapeutic concentrations for long periods* (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; RETI et al., 2013; REDONDO et al., 2014).

The non-therapeutic use of antibiotics in food-animals is quite old. The growth promoting effect was first described by Moore et al. (1946), soon the end of

the war. It was reported that chicks showed better growth when sulfasuxidine and streptomycin were added to the diet. Shortly thereafter, Stokstad et al. (1949) observed that chickens fed with aureomycin fermentation byproducts had better weight gain with less feed. Numerous subsequent investigations have documented the same efficacy for other food-animals and similar effects were also identified in other antibiotics (BARTLEY; FOUNTAINE; ATKESON, 1950; CUNHA et al., 1950; COATES et al., 1951; RUSOFF, DAVIS; ALFORD, 1951; SLINGER et al., 1951; SHEFFY et al., 1952; LASSITER, 1955).

In 1951, the United States approved the use of AGPs in animals (JONES; RICKE, 2003; HUME, 2011). In the following years, European countries approved regulations about the use of antibiotics in animal feeds (CASTANON, 2007). This practice was, therefore, implemented as a way to meet the increasing demand for food (ALLEN et al., 2013), coinciding with the modernization of the livestock system, which began involving confinement rearing of food animals in a large scale (GUSTAFSON; BOWEN, 1997; MATHEW; CISSELL; LIAMTHONG, 2007). Over time, the practice of non-therapeutic use of antibiotics has become an integral part of intensive livestock (BARTON, 2000; BUTAYE, DEVRIESE; HAESEBROUCK, 2003; LAXMINARAYAN et al., 2013).

Many hypotheses have been launched in an attempt to unravel completely the AGP mode of action. What is clear is that the action is mediated by antibacterial effect, since the effects in germ-free animals are smaller or zero (COATES et al., 1963; FEIGHNER; DASHKEVICZ, 1987; PAGE, 2006; NIEWOLD, 2007). Therefore, the studies on mechanisms have focused the interaction between antibiotics and the microbiota, favoring performance in different ways: (i) improvement in the absorption and utilization of nutrients because of thinning of the intestinal wall (COATES; DAVIES; KON, 1955; FEIGHNER; DASHKEVICZ, 1987; GASKINS; COLLIER; ANDERSON, 2002; PAGE, 2006; NIEWOLD, 2007); (ii) reduction in the incidence and severity of intestinal subclinical infections, leading to reduction of metabolic costs of the immune system (innate) (FEIGHNER; DASHKEVICZ, 1987; GASKINS; COLLIER; ANDERSON, 2002; BRENNAN et al., 2003; DIBNER; RICHARDS, 2005); (iii) reduction of microbial use of nutrients (FEIGHNER; DASHKEVICZ, 1987; DIBNER; RICHARDS, 2005; NIEWOLD, 2007; HUYGHEBAERT, DUCATELLE AND IMMERSSEEL, 2011); (iv) reducing the toxins production by intestinal bacteria (KNARREBORG et al., 2004; DIBNER; RICHARDS, 2005; PAGE, 2006; NIEWOLD,

2007; LIN, 2014); (v) stimulation of vitamins synthesis, and (PAGE, 2006; MODI et al., 2011); (vi) anti-inflammatory effect by inhibiting the production and excretion of catabolic intestinal inflammatory mediators by cells, thereby providing the catabolic advantage to the host (NIEWOLD, 2007; COSTA et al., 2011; HUYGHEBAERT; DUCATELLE; IMMERSEEL, 2011; MENCONI et al., 2014).

1.3.5 Banned Antibiotic Growth Promoters

Discussions about the use of AGPs are therefore old and their use is controversial due to the potential transfer of antibiotic resistance from animals to humans (KELLY et al., 2004), aggravated the fact that there is no clear division between antibiotics for human and animal use (HEILIG; LEE; BRESLOW, 2002; WEGENER, 2003; LANDERS et al., 2012).

Evidence of resistance in animals-production began to appear shortly after the beginning of utilization. Elam, Gee and Couch (1951) reported penicillin resistant microorganisms in chicks receiving a feed containing such antibiotic. In the same year, Starr and Reynolds (1951) identified streptomycin resistance bacteria in turkeys fed streptomycin. In the 1960s, alarmed by the rise in multidrug-resistant enterobacteria, resistance transmission evidence of antibiotics to animals for human and the widespread use of antimicrobial agents as growth promoters, the United Kingdom's *Swann Report* of 1969 recognized the possibility that AGPs were contributing largely to the problem of drug-resistant infections (SCIENCE AND TECHNOLOGY COMMITTEE, 1998; WITTE, 2000; MARSHALL; LEVY, 2011). Therefore, recommended banning the use of human or animal therapeutics antibiotics as growth promoter for animals (HOUSE OF LORDS, 1998). The recommendation was implemented first in England and then in other European countries and Canada (HOUSE OF LORDS, 1998; AARESTRUP, 2005; MARSHALL; LEVY, 2011).

Despite the Swann Report, the first prohibition of the use of any antibiotic in order to promote growth in animals came only 17 years later, in 1986, in Sweden (WIERUP, 2001). Following the bans by Sweden, Denmark and Norway banned the use of avoparcin as growth promoter in 1995 (HOFSHAGEN et al., 2000; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). In the same year, the Norwegian food animal industry voluntarily stopped all use of AGPs (GRAVE et al., 2006).

EU banned the use of other antibiotics as growth promoters in the following years, such as avoparcin, virginiamycin, tylosin, bacitracin, spiramycin, carbadox and olaquinox (DIBNER; RICHARDS, 2005). The Danish food animal industries decided in 1998 to voluntarily discontinue all further use of AGPs by the end of 1999, thus the AGPs were gradually phased out in Denmark (AARESTRUP et al., 2001). Finally, in 2006, all AGPs were banned in the EU (EC, 2005). However, other regions have not followed this suit. The practice continued in the United States, but the Food and Drug Administration (FDA) proposed a plan of action on the overuse of antibiotics through a project of guidelines for judicious use of antimicrobials in animal husbandry for food production (ALLEN et al., 2013; LAXMINARAYAN et al., 2013; HEDE, 2014). Importantly, many countries, organizations and professional associations have developed (or are in the process of developing) guidelines and codes for the prudent use of antibiotics in animals (BARTON, 2000; GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2008; WERTHEIM et al., 2013; WHO, 2015).

1.3.6 Estimate Antibiotic Use for Food-Producing Animals

There is a correlation between the antibiotic consumption and subsequent development of antibiotics resistance (BELL et al., 2014). Countries with high antibiotic prescription rates tend to reach unacceptable levels of resistance, making ineffective most of the drugs (GARAU et al., 2014). Since its introduction, millions of tons of antibiotics have been produced and employed for a wide variety of purposes (DAVIES; DAVIES, 2010), however data for amounts of antibiotics sold for or used in animals are still scarce (LAXMINARAYAN et al., 2013). Reliable figures are rare, and estimates are only available for a few regions of the world (WHO, 2002; AARESTRUP, 2005).

The FDA recently released a report of sales and distribution data of antibiotics used in food-producing animals. The amount of important antibiotics sold grew by 16% from 2009 to 2012, totaling about 54,000 tons sold in this period, only in 2012 were sold 14,618 tons of antibiotics (FDA, 2014b). A few years ago (MELLON; BENBROOK; BENBROOK, 2001), estimated values were well next to recently released by FDA, in their report, estimated 16 million kg of antimicrobial compounds are used annually in the US, and approximately 70% are used for nontherapeutic purpose.

In EU and European Economic Area (EAA), sales achieved 8,046 tons of antibiotics in 2012 (EMA/ESVAC, 2014). Australia, between 2005 to 2010, had consumed 2,932 tons, and 6% were used as growth promoters (APVMA, 2014). In the same period, Japan sold 687 tons of antibiotics, and in New Zealand, among 2004-2008, 32 tons of antibiotics were used (NVAL/MAFF, 2009; MAF, 2010; HOSOI et al., 2014).

Sweden, Denmark and Norway, the first countries to ban the use of AGPs in food-producing animals, had over the years, the significant decrease in the amount of antibiotics used (GRAVE et al., 2006). Sweden reduced from 21 tons of antibiotics consumed in 1996 to 11 tons in 2013, a decrease of approximately 48% (BENGTSSON et al., 2001; ASPEVALL et al., 2014). Sales of antibiotics in Denmark and Norway, between 1994 and 2013, were reduced from 206 tons to 112 tons and 11 tons to 6 tons, respectively, reaching 46% reduction in sales (BLAGER et al., 1999; HOFSHAGEN et al., 2000; AGERSØ et al., 2014; ANDERSEN et al., 2014). It is also possible to observe reduction in antibiotics sales in other EU countries, such as France, United Kingdom, Netherlands and Czech Republic. Together, these countries reduced sales by 35%, from 2,366 tons in 2005 to 1,543 tons in 2012 (EMA, 2011; EMA/ESVAC, 2014).

Different organizations and experts in the field continue to question the use of antibiotics in food-producing animals (ASOA, 2014; RUMA, 2014; SCIENCE AND TECHNOLOGY COMMITTEE, 2014). Conflicts for a responsible prophylactic use are evident. Thus, the prohibition of AGPs seems not to prevent prolonged and routine use of such antibiotics in healthy animals.

1.4 NEED FOR ALTERNATIVES TO REPLACE ANTIBIOTICS

The use of antibiotics in food-producing animals favors the selection of resistant bacteria (ZHAO et al., 2005; GULLBERG et al., 2011). In a globalized world, this problem is even more urgent, since resistance genes are travelling faster and over long distances (VERNET et al., 2014). Oblivious to these facts the question of pipeline of new drugs is faltering (TOMAYKO et al., 2014).

The removal of antibiotics as AGPs appears to result in a decrease in the prevalence of some resistant bacteria (PANTOSTI et al., 1999; VAN DEN BOGAARD; BRUINSMA; STOBBERINGH, 2000; BOERLIN et al., 2001;

LAUDERDALE et al., 2007). However, negative impacts on productivity, health and animal welfare are described (AARESTRUP, 2002; CALLESEN, 2002; TORNØE, 2002; COGLIANI; GOOSSENS; GREKO, 2011). There is an increased incidence of infectious diseases, leading to an increased use of antibiotics for therapeutic purposes (LARSEN, 2002; CASEWELL et al., 2003). This generates an increase in animal production costs and therefore making the final product more onerous (FERBER, 2003; KELLY et al., 2004).

Increasing restrictions on antibiotic propose challenges to modern livestock and related industries. Viable and effective alternatives are required to maintain the current animal production levels without threatening public health (WANG et al., 2012). The challenge is complex. It is required that such alternatives contribute to the stagnation of resistance to antibiotics, show effectiveness on animal performance and assist in the reduction or elimination of pathogens, thereby controlling the morbidity and mortality (GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; ALLEN et al., 2013).

On the economic and financial aspects, returns on investments for alternatives to antibiotics are dependent on the biological impact, dynamics of the market price and effect on the performance levels (REDONDO et al., 2014). Furthermore, (HUYGHEBAERT; DUCATELLE; IMMERSEEL, 2011) reinforce the need to consider the variability in production costs between the different possible alternatives. The same authors estimate that the returns on investments can vary among 2-25 (€ / ton) compared to 1-2 (€ / ton) of feed antibiotics.

Several alternatives to antibiotics have been proposed, include the use of pre-, pro- and symbiotics (CALLAWAY et al., 2008; GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; HUYGHEBAERT; DUCATELLE; IMMERSEEL, 2011), antibacterial vaccines (ALEKSHUN; LEVY, 2004), paghe therapy (ATTERBURY, 2009; PIRNAY et al., 2011), herbs, plant extracts and etheric oils (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; GUPTA et al., 2007; WINDISCH et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; DJENANE et al., 2011; YAN; MENG; KIM, 2012), exogenous enzymes (JACKSON et al., 2003; ADEOLA; COWIESON, 2011; LIU; GUO; GUO, 2012; ZHANG et al., 2014), organic acids (JOHNY et al., 2009; SANTOS et al., 2009; JOHNY et al., 2012), cooper and zinc (PETTIGREW, 2006; JACELA; DEROUCHEY; TOKACH, 2010; AMACHAWADI et al., 2011) and anti-virulence therapies (CEGELSKI et al., 2008; RASKO; SPERANDIO, 2010). Moreover, in a recent review, (THACKER, 2013)

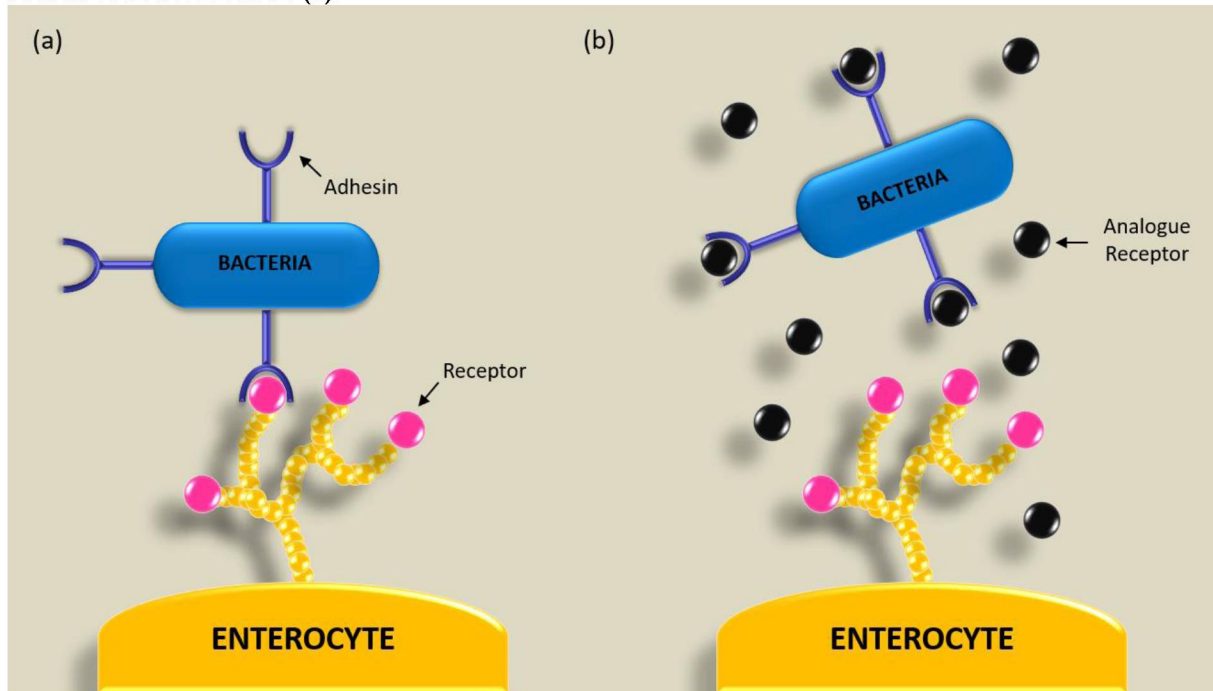
described less traditional alternatives to antibiotics as antimicrobial peptides, clay minerals, egg yolk antibodies, eucalyptus oil-medium chain fatty acids, rare earth elements and recombinant enzymes.

Glycoconjugates, polysaccharides and/or oligosaccharides can act as modulators of intestinal microbiota and often are mistakenly categorized as prebiotic. Gibson and Roberfroid (1995) define prebiotic as nondigestible food ingredients that stimulate the growth and/or activity of bacterial resident in colon, beneficially affecting the health of the host. In addition of prebiotic activity, these carbohydrates and glycoconjugates may act on another mechanism, modulating the intestinal microbiota by eliminating pathogenic bacteria. In summary, these molecules mimicking the receptors located in the intestinal mucosa of the host, leading to inhibition of adhesion of pathogenic bacteria and therefore infection. Various saccharides have been reported in the literature with this property.

1.4.1 Use of Analogue Receptors

Pathogens adhesion to the gut epithelium surface (colonization) is the first critical step in the infection process (OFEK; MIRELMAN; SHARON, 1977; WILSON et al., 2002). It is mediated by specific adhesins. There are three main types of adhesin-receptor interactions: lectin-carbohydrate; protein-protein and protein-hydrophobins (OFEK; SHARON; ABRAHAM, 2006). Lectins-carbohydrate-interactions are widespread in most pathogens, so it has been extensively studied (OFEK; HASTY; SHARON, 2003). It is important for cell-cell communication in various physiological processes and have a crucial role in the pathogenic event (LINDHORST; KIEBURG; KRALLMANN-WENZEL, 1998). The lectins recognize and bind to complementary available carbohydrates on the surface of the host intestinal tissue, thereby initiating the process of bacterial adhesion (BURGER et al., 2000) (Figure 1.1). Thus, strategies using anti-adhesion agents, named analogue receptors, can be effective in reducing infections, disease and the risk of transmission (BECKER et al., 2007). Furthermore, anti-adhesion therapy appears to be safer, softer and sustainable with the added benefit of minimizing selective pressure because the pathogens are prevented from binding to host cells rather than being killed (THOMAS, 2010).

FIGURE 1.1 - NORMAL ADHESION MECHANISM: ADHESINS PRESENT ON THE SURFACE OF THE BACTERIA BINDS TO COMPLEMENTARY RECEPTOR ON THE SURFACE OF THE HOST ENTERIC TISSUE (a); USE OF ANALOGUE RECEPTORS: THE BACTERIA VIA CARBOHYDRATE-SPECIFIC ADHESINS BINDS TO THESE RECEPTORS, WHICH ARE SACCHARIDES STRUCTURALLY SIMILAR TO THE NATIVE RECEPTORS. THUS, ADHESION DOES NOT HAPPEN AND THE BACTERIA ALONG WITH THE ANALOGUE RECEPTOR ARE ELIMINATED FROM THE INTESTINE (b).



SOURCE: Adapted from MORAN (2009).

Yeast derivatives, such as yeast cell wall and yeast autolysate products, have been sold in the feed supplements market for a long time, reaching worldwide. These products contain mainly mannose in their structure and claim to bind and reduce enteropathogenic bacteria. Various *in vivo* studies (LINE et al., 1998; SPRING et al., 2000; HOFACRE et al., 2003; MOURÃO et al., 2006; BAURHOO et al., 2007; BIGGS; PARSONS, 2008; YANG et al., 2008; BAURHOO; GOLDFLUS; ZHAO, 2009; JACOBS; PARSONS, 2009; EL-KHALEK et al., 2012) and *in vitro* (SALIT; GOTSCHLICH, 1977; KORHONEN et al., 1980; MIRELMAN; ALTMANN; ESHDAT, 1980; FERNANDEZ; HINTON; VAN GILS, 2000; 2002; BECKER; GALLETTI, 2008; BOROWSKY, CORCAO; CARDOSO, 2009; GANAN et al., 2009; GANNER et al., 2010; BADIA et al., 2012; BADIA et al., 2013; GANNER et al., 2013) showed the benefits of these products on animal health and performance. The presence of mannose is essential. It binds to the pathogen adhesin, preventing the adhesion to the receptor in the gut wall, leading to elimination of bacteria with the digesta flow.

Though, there is much confusion throughout the animal feed industry concerning the quality of yeast products (GANNER et al., 2013). As result, products derived from other sources have gained ground. Mannose-based polysaccharides obtained from various gums types are subject of several patents and researches around the world (SHINICHI; TAKASHI; MITSURO, 1996; TSUTOMU; YUKIKO; SHIGEMITSU, 1996; KROSS, 2000; BARBERÀ; SANZ, 2003; BARBERÀ et al., 2009a; BARBERÀ et al., 2009b; BADIA et al., 2012; BADIA et al., 2013).

Patents claiming products with anti-adhesion ability is not restricted to saccharides containing mannose. Derived from various sources containing different monosaccharides residues are also objects of invention documents, as macro and microalgae polysaccharides (LINDBERG; SVENSSON, 1983; PRIETO; RUIZ-PALACIOS, 1999; AJISAKA; TOBA, 2002; VIEIRA; DE MORAIS, 2008; NOSEDA et al., 2013), food ingredients (NEESER; WURSCH, 1990; BAILLON; GIFFARD, 2001; NOSEDA et al., 2012), milk (MORROW; NEWBURG; RUIZ-PALACIOS, 2010), glycoproteins (SAKANAKA et al., 2002) and synthetic compounds (SCHENGRUND; THOMPSON, 1998; HEERZE; ARMSTRONG, 2000; VANMAELE; ARMSTRONG, 2000; MUNIR et al., 2001; YANMAELE; ARMSTRONG, 2001; KLINGEBERG et al., 2003; KLINGEBERG et al., 2006; BRUGGEMAN; DESCHEPPER, 2007; STUTZENBERGER et al., 2010; MORROW; NEWBURG; RUIZ-PALACIOS, 2011b; a; BRUGGEMAN; DESCHEPPER, 2014).

There are, however, some important practical uncertainties concerning the use of analogue receptors. Some of these questions are due doubts of the exact mechanisms related to the anchoring of many strains to the enterocytes surface (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010). It is known that most pathogens possess genes encoding more than one type of adhesin, so that during the infectious process more than one of these adhesins can be expressed by the pathogen population (OFEK; HASTY; SHARON, 2003; WITTSCHIER et al., 2007). Moreover, the adhesion may also involve other factors, such as hydrophobic interactions or other non-specific interactions. For the anti-adhesion therapy to be completely effective, it is necessary the use of multiple agents that specifically inhibit each adhesin type of the infecting pathogen, or a single agent with anti-adhesion broad spectrum of activity (BECKER; GALLETTI, 2008; THOMAS, 2010).

Numerous studies have been conducted over the past 30 years trying to find viable and effective alternatives to minimize the use of antibiotics and elucidate the

adhesion process for the different strains involved in foodborne illness (Appendix 1, 2 and 3).

1.5 CARBOHYDRATES AND GLYCOCONJUGATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS AND ACT AS ALTERNATIVE TO ANTIBIOTICS

1.5.1 Alternatives to Control *Campylobacter*

Adhesion of *C. jejuni* to the epithelium of the small intestine and colon is mediated by polar flagella and outer membrane adhesins, including PEB1a, PEB3, JlpA, MOMP, CapA and CadF (KONKEL et al., 2001; VAN VLIET; KETLEY, 2001; MAHDAVI et al., 2014). The use of anti-adhesive compounds for prevention and treatment of campylobacteriosis is increasingly being discussed, but so far, few data are available.

Some monosaccharides have been identified over the years as potential inhibitors of bacteria of the genus *Campylobacter*. L-Fucose and D-mannose partially inhibited adhesion of *C. jejuni* to intestinal cells, suggesting the presence of different adhesins, which cooperate for binding of the pathogen to the host (CINCO et al., 1984; MCSWEEGAN; WALKER, 1986). Before long, Naess, Johannessen and Hofstad (1988) observed that L-rhamnose caused a slight reduction in adhesion of *C. jejuni* and *C. coli* to porcine intestinal brush border membranes. D-Galactose, D-mannose, D-maltose and D-glucose, but not the L-sugar equivalents, inhibited, in a dose-dependent manner, the binding of *C. jejuni* to human colonic Caco-2 cells (RUSSELL; BLAKE, 1994). More recently, Day et al. (2009) demonstrated, through glycan array, that *C. jejuni* has preference for gastrointestinal niches within host tissues containing terminal mannose, *N*-acetylneuraminic acid, galactose or fucose.

Bode (2012) reviewed the properties of human milk oligosaccharides. Glycans containing fucose α -(1→2)-linked are associated with the prevention of *C. jejuni*. Lane, Mariño, Naughton, et al. (2012) identified that oligosaccharides from bovine colostrum also prevent infection by *Campylobacter*. It was observed that these oligosaccharides dramatically reduced the invasion and translocation of bacteria to HT-29 cells in a concentration dependent manner. Furthermore, bovine colostrum oligosaccharides completely prevented the pathogen binding to chicken

intestinal mucin, *in vitro*. Treatment of oligosaccharides with periodate led to loss of anti-adhesion activity, suggesting a direct oligosaccharide-bacterial interaction.

Ganan et al. (2010) investigated the ability of pectic oligosaccharides to inhibit adherence and invasion of Caco-2 cells by *C. jejuni*. Pectic oligosaccharides were extracted from Valencia orange mesocarp using nanofiltration. The equal amounts of galacturonic acid and rhamnose suggest that oligosaccharides are derived from a rhamnogalacturonan I (rhamnose and galacturonic acid in the backbone with arabinose and galactose attached to the rhamnose in side-chains). The results of the present study indicate that pectic oligosaccharides did not significantly affect the adherence of pathogen to Caco-2, however, can affect the invasion of intestinal epithelial cells. Thus, it was concluded that the oligosaccharides interfere with cell invasion by altering the effectiveness of cell adhesion.

Wittschier et al. (2007) and Lengsfeld, Faller and Hensel (2007) studied polysaccharides isolated from fruit of the okra plant (*Abelmoschus esculentus*). Results revealed the presence of rhamnogalacturonans type I in the fractions that showed anti-adhesive activity *in vitro*. However, this positive anti-adhesive effect under *in vitro* conditions were not reproduced under conditions *in vivo*, indicating that intestinal decontamination of previously infected chickens with *C. jejuni* is not possible by the oral application of these compounds.

Byrne, Clyne and Bourke (2007) compared the interaction of human and chicken mucus with *C. jejuni*. The results showed that chicken mucus, but not human mucus, significantly reduced the interaction of the pathogen to the intestinal epithelium cells. Reduction of invasion and cell adhesion was dose-dependent manner. Given the evidence obtained, the authors suggest that one of the chicken mucus components can be responsible for the differences between humans and birds after exposure to the pathogen. Alemka et al. (2010) demonstrated that mucins purified from small and large intestines of chicken inhibited adhesion and internalization of *C. jejuni* to human intestinal cell line HCT-8. To assess whether glycosylated portion of mucin were involved in inhibition activities, mucins were treated with sodium metaperiodate. Binding and internalization by HCT-8 cells returned to levels observed in the untreated controls, demonstrating that the O-glycans expressed on the secreted intestinal mucins of chickens can inhibit pathogen colonization. Similar results were presented by Struwe et al. (2015). Purified mucin from chicken's intestine also inhibited adhesion and invasion of *C. jejuni* to HCT-8

cells. Several structures, absent in human intestinal mucins, were identified in chicken mucins, besides that O-glycans released from chicken mucin are more sulphated compared to human mucin.

1.5.2 Alternatives to Control *Salmonella*

The pathogenesis of *Salmonella enterica* infections requires adherence to various host cell surfaces, and a wide number of adhesive structures may be found. Adhesive mechanisms of *S. enterica* were reviewed by Wagner and Hensel (2011). Gene clusters for more than 10 different fimbrial adhesins were identified, depending on the serotype, with type I fimbriae such as *Fim*, *Lpf* (long polar fimbriae), *Tafi* (thin aggregative fimbriae) or the type IV pili. In addition, non-fimbrial adhesins have been identified as adhesins secreted by type I secretion systems and autotransporter adhesins. The structural and functional properties of many adhesins are not completely understood (WAGNER; HENSEL, 2011). FimH is the best-studied and the most common fimbrial adhesin (KISIELA et al., 2006). It is encoded by the *fim* operon, highly specific for mannose residues (CLEGG; GERLACH, 1987).

Feed supplemented with various components to eliminate *Salmonella* from the intestine has been investigated. D-Mannose and α -methylmannoside has been widely reported to suppress the colonization of *S. enterica* sv. Enteritidis and *S. enterica* sv. Typhimurium *in vitro* (OLD, 1972; KORHONEN et al., 1980; LINDQUIST et al., 1987; MCHAN et al., 1989; OYOFO et al., 1989; PARKER et al., 2010) and *in vivo* (OYOFO et al., 1989a; OYOFO et al., 1989b; AGUNOS et al., 2007). These studies also demonstrated the anti-adhesion ability of other monosaccharides as L-arabinose, D-galactose, L-fucose, D-fructose and N-acetylgalactosamine, and disaccharides as lactose and β -1,4-mannobiose. Moreover, studies by Chessa et al. (2009) showed that the *std* operon present in *S. enterica* sv. Typhimurium encodes α (1-2)-fucosylated residues. Thus, adhesion of the bacteria to Caco-2 cells was blocked by Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc.

Ishihara et al. (2000) evaluated the *in vivo* potential by enzymatic hydrolysates of galactomannans derived from guar gum (*Cyamopsis tetragonolobus*). The results indicate an increase in the number of beneficial bacteria and decrease the incidence and number of pathogenic bacteria, suggesting that the

hydrolyzed promotes the excretion of *S. enterica* sv. Enteritidis. Searle et al. (2009); Searle et al. (2010) and Tzortzis et al. (2005) showed that nondigestible oligosaccharides such as galactoligosaccharides reduced *Salmonella* adhesion and invasion *in vitro* in the human colonic cell line (HT-29) and also *in vivo* in the ileum gut loop model in mice.

Parkar et al. (2010) compared different pectic polysaccharides obtained from the kiwifruit cultivar *Actinidia deliciosa* Hayward. Pectin called Monok, extracted with monopotassium phosphate, was superior to commercial products (inulin, guar gum and citrus pectin), enhancing the adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* and decreasing the adhesion of *S. enterica* sv. Typhimurium to Caco-2 cells. Galacturonic acid was the dominant sugar residue in this fraction, comprising around 87% of the total, followed by galactose, arabinose and small amounts of other sugar. Similar results were presented by Roberts et al. (2013). Acid polysaccharides from plantain (*Musa* spp.) also inhibited the adhesion of *S. enterica* sv. Typhimurium to Caco-2 cells.

Feed and food ingredients were evaluated by Becker et al. (2007) and Becker and Galletti (2008) for the ability to bind to different strains of *Salmonella*. Extracts of pumpkin, sesame, sunflower, carrots, palm kernel, soybean tempe, konjac, thyme, tomato and Biomos® were able to bind enterobacteria. Several studies demonstrated the anti-adhesion capacity for *S. enterica* sv. Enteritidis by palm kernel extracts (SUNDU; KUMAR; DINGLE, 2006). These extracts are obtained from *Elaeis guineensis* and may comprise small amounts of xylan, arabinans, galactans, glucans and mannans.

Many glycoconjugates have proved active against *Salmonella*. Yang et al. (2008) isolated by enzymatic hydrolysis a soy glycopeptide, β -conglycinin, capable of minimizing the adhesion of *S. enterica* sv. Typhimurium to LoVo cells (human colon adenocarcinoma cell line). β -Conglycinin is a glycoprotein which contains approximately 5% carbohydrate, being mainly high-mannose moieties, followed by *N*-acetylglucosamine. It is suggested that the mannose structure is responsible for bacterial recognition.

Recently, Sakarya et al. (2010) showed that the presence of *N*-acetylneuraminic acid increases *S. enterica* spp. *enterica* sv. Tiphly recognition capability. Sialylglycopeptide, sialyloligosaccharide and its asialooligosaccharides derived from hen egg yolk inhibited the *S. enterica* sv. Enteritidis adhesion to Caco-2

cells (SUGITA-KONISHI et al., 2002). *In vivo* assays showed, however, that these molecules were rapidly absorbed in the gastrointestinal tract. In trying to solve the problem, Sugita-Konishi et al. (2004) conjugated sialylglycopeptide to carboxymethyl-dextran via EDC (1-ethyl-3-dimethylaminopropyl-carbodiimide) reaction. Further *in vivo* tests results showed that sialylglycopeptide-CMD was able to inhibit *Salmonella* at a concentration of 10 μ M. Ghosh et al. (1996) and Vimal et al. (2000) describe glycoproteins obtained from rat intestinal brush border and mucus membrane. Cell adhesion of *S. enterica* sv. Typhimurium was inhibited by these glycoproteins. Fractionation of the molecules indicated the presence of mannose in the fractions with maximum activity. Thus, it is suggested that the mannose is recognized by the bacterial fimbriae during the recognition process.

Fractions derived from human and bovine milk containing acid and neutral oligosaccharides (COPPA et al., 2006; MALDONADO-GOMEZ et al., 2015), α -lactoalbumin, glycomacropeptide (BRUCK et al., 2006), sulfatides (NEWBURG et al., 1999) and mucin (PARKER et al., 2010) showed potential to act in *Salmonella* prevention, since inhibited the adhesion of pathogens to different cells lines.

1.5.3 Alternatives to Control *Escherichia*

The classification of enteropathogenic *E. coli* is related to their virulence properties: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxinogenic *E. coli* (ETEC), enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), verotoxinogenic *E. coli* (VTEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998). During the last years, several adhesins and putative colonisation factors have been described for each of the *E. coli* strains (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010).

ETEC is among the most common *E. coli* strains causing diarrhea-associated morbidity and mortality (ZHANG; SACK, 2012) followed EPEC (EVANS; EVANS, 1996). Fimbriae expressed by ETEC isolated from animals include K88 (F4), F18, K99 (F5), 987P (F6), and F41 (F7) (ZHANG et al., 2007) and isolated from humans include colonization factor antigens (CFA) CFA/I and CFA/II (EVANS; EVANS; DUPONT, 1979; BLANCO; GONZALEZ; ANADON, 1985).

Payne, O'reilly and Williamson (1993); Grange et al. (1998); Grange et al. (1999) and Grange et al. (2002) studied the intestinal receptors K88 (F4) fimbrial

adhesin. It was revealed that these receptors are composed of *N*- and *O*-glycans containing galactose, glucose, sialic acid, mannose, *N*-acetylhexosamine and fucose. However, ETEC preferentially binds to *N*-acetylhexosamine (HexNAc), in the terminal position or, alternatively, in the penultimate position with galactose in the terminal position. Bind to D-galactosamine (LAUX et al., 1986) and terminal β -D-galactosil (GIBBONS; JONES; SELLWOOD, 1975) have also been described.

Gonzalez-Ortiz et al. (2013); Gonzalez-Ortiz et al. (2014) and Hermes et al. (2011) compared the ability of different feed ingredients, to bind to ETEC K88, using *in vitro* microtitration-based models, and reduce bacteria attachment to the porcine intestinal epithelial cell-line (IPEC-J2) and mucus. Casein glycomacropeptide (CGMP), locust bean, wheat bran and exopolysaccharide (EPS) from olive fermentation brines exhibited the highest adhesion to pathogen and decreased the number of bacteria adhered to the cells and the intestinal mucus. CGMP is a glycoprotein originated during cheese manufacture. Contains heterogenous glycosilation sites, based on a core of Gal β -(1 \rightarrow 3)-GalNAc- and NeuAc-(2 \rightarrow 5)-Gal-, which may act as potential analogue receptors. The locust bean was obtained from the *Ceratonia siliqua* tree (mixing locust pods and seeds). Analysis of locust bean extracts has identified the presence of galactomannans and phenolic compounds. Wheat bran is a by-product rich in carbohydrates (arabinoxylans and glucans) and proteins. Enzymatic fractionation of wheat bran extracts identified that the glycoproteins present may be involved in the recognition process of K88 fimbriae. The EPS is derived from the natural fermentation process of green olive brines by *Lactobacillus pentosus*, and mainly containing glucose, galactose and rhamnose. According to authors, EPS could offer several complementary molecules to bacterial and mucus lectins due to complex chemical structures of the present polysaccharides. Thus, these products become good candidates against colibacillosis, since they can be included in the animal's diet.

In vivo experiments in pigs challenged with ETEC K88 also showed that supplementation of animal diet with wheat bran results in reduction in the incidence of diarrhea and the number of *E. coli* in the intestinal tract (HERMES et al., 2009; MOLIST et al., 2010; MOLIST et al., 2011). This reduction may result from the promotion of beneficial bacteria favoring the competitive exclusion and/or binding capacity to ETEC. Similar results have also been reported in experiments with animals supplementation CGMP (HERMES et al., 2013).

Other *in vitro* studies also describe the effect of glycans on the adhesion of ETEC. EPS containing glucose, galactose and fructose produced by *Bifidobacterium breve* (ALP et al., 2010) and *Lactobacillus reuteri* (WANG; GÄNZLE; SCHWAB, 2010) impeded effectively the adhesion of *E. coli* to Caco-2 cells and hemagglutination of porcine erythrocytes.

Roubos-Van Den Hil and Nout (2011) reviewed various studies on the influence of soybean tempe on the adhesion of ETEC to intestinal cells. Tempe is a fermented food made from boiled soybean inoculated with a fungus, usually of the genus *Rhizopus* (KIERS et al., 2002). Soybean tempe extract prevent adhesion *in vitro* of ETEC to intestinal epithelial cells. *In vivo* experiments show that dietary supplementation of animals, with tempe, reduces ETEC excretion, incidence, duration and severity of diarrhea in animals. Inhibition of adhesion, which results in anti-diarrheal effect, is mediated by carbohydrates present in the soybean tempe extracts. Purification experiments have indicated that arabinose, responsible for the bioactivity, originate from arabinan or arabinogalactan of soybean pectin side chains.

Besides soybean tempe, tofu, extracts of raw, soaked and cooked soya beans can reduce adhesion *in vitro* of ETEC K88 to Caco-2 intestinal epithelial cells (ROUBOS-VAN DEN HIL et al., 2009) and piglet intestinal brush border cells (MO; ZHU; NOUT, 2012), although the effect was lower than that of tempe extracts. Traditionally, tempe is made from soybean, however other substrates were also reported to be suitable substrates to produce tempe. Roubos-Van Den Hil et al. (2010) studied different cooked and fermented products with *Rhizopus microspores* var. *microsporus*. Soybean, cowpea, green pea and red beans cooked and fermented significantly inhibited the adhesion of the pathogen to intestinal cells to values lower than 20% of the positive control. Anti-adhesion activity increased after the fermentation process. Authors suggest that during the fermentation process an active component was released or formed by enzymatic hydrolysis from leguminous substrates. Glycopeptide derived from soybean β -conglycinin was also able to decrease the adhesion of EPEC strains O114 and O111 to LoVo cells (YANG et al., 2008).

Der Meulen, Panneman and Jansman (2010) evaluated the effect of inclusion of pea (*Pisum sativum*), faba beans (*Vicia faba*) and their hull fractions in diets for piglets orally infected with ETEC serotype O149:K91:K88. From 10 days after the challenge, there was no fecal excretion of pathogen in any of animals. The

use of legume seeds or their hull also caused a change in the ileal microbiota composition suggesting a potential for prevention of intestinal disorders in piglets. Right after, Becker et al. (2012) studied the binding capacity of different grain fractions from pea and faba beans to ETEC K88ac. Pea hulls, specially, showed a higher binding to bacteria and its characteristics and binding capacity were preserved even after *in vitro* digestion. ETEC may be binding to xyloglucan α 1,2-fucosyltransferase present in pea seeds, offering an alternative of binding sites.

The binding capability to enteropathogens of other food and feed components was tested by Becker and Galletti (2008). Pumpkin, tempe, sesame, sunflower, tomate, coffe, artchoke and Biomos[®] were most efficient binding matrices to ETEC serotypes O149:K91:K88ac and O9:K35:K99. Sesame seed extract was effective both *in vitro* and *in vivo* to bind ETEC K88 (MAIORANO et al., 2007). Sesame seed extract reduced the number of *E. coli* faecal and improved faeces consistency in weaning pig challenging with pathogen.

Rhoades et al. (2006) examined the potential of commercial chito-oligosaccharides as antiadhesive agents against strains of *E. coli* (VTEC; EPEC). Chito-oligosaccharides (97% deacetylated, degree of polymerisation~4), composed of glucosamine with smaller quantities of *N*-acetylglucosamine inhibited the EPEC adherence to HT-29 human cells. Quintero-Villegas et al. (2013) evaluated the ability to chito-oligosaccharides of varied degree of polymerization and acetylation to inhibit the adhesion of EPEC to HEp-2 cells. Hydrolysates with a low degree of acetylation were more effective in reducing adhesion. The degree of polymerization did not influence the adhesion potential. The same oligosaccharides were investigated by Liu et al. (2008) and Liu et al. (2010) as the ability to impede adherence by ETEC K88 in pigs. Results showed that animals group fed a diet supplemented with chito-oligosaccharides had a decrease in incidence of diarrhea caused by the pathogen. The reason suggested may be due to an increase in the concentration of beneficial bacteria (*Lactobacillus*) and reduced population of *E. coli* in the intestinal tract favored by declining the adhesion of pathogen to intestinal cells.

The anti-adhesion potential, *in vitro* and *in vivo*, of synthesized galactooligosaccharides (GOS) were evaluated by Tzortzis et al. (2005). GOS were produced by the activity of galactosyltransferases from *Bifidobacterium bifidum* 41171 on lactose. The novel GOS mixture and the disaccharidic fraction impeded the EPEC adhesion to HT-29 cells. Disaccharidic fraction, composed of two galactose

units $\alpha(1\rightarrow6)$ -linked, inhibited 90% of the adhesion. The administration of GOS mixture also increased the density of *Bifidobacteria* when added to commercial diet of piglets, suggesting a great prebiotic potential. Shoaf et al. (2006) tested adherence of EPEC strain E2348/69 (O127:H6) on HEp-2 and Caco-2 cells, in the presence of several oligosaccharides. Commercial GOS exhibited the greatest adherence inhibition on both cells lines, reducing the adherence, dose dependent manner, about 70%. The lactulose ($\beta\text{Gal-(1}\rightarrow4\text{)-}\beta\text{-Fru}$) also significantly prevented adhesion for both cell lines. Galactose monosaccharide, when tested alone, did not showed activity.

Aqueous extracts from carrots (carrot soup) containing acidic oligosaccharides and acid polysaccharides from plantain (*Musa* spp.) are able to block adherence of EPEC and ETEC to HEp-2 and Caco-2 cells *in vitro* (KASTNER et al., 2002; ROBERTS et al., 2013). Furthermore, it was observed that the adhesion blocking ability is dependent on the degree of polymerization of the molecule. For oligosaccharides from carrots, the trigalacturonic acid was the most effective. Rhoades et al. (2008) also reported the anti-adhesion effects of pectic oligosaccharides from orange peel purified against VTEC and EPEC. Dose of $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of oligosaccharides was effective to reduce 70% of the pathogen attachment to HT-29 cells compared to the negative control. More information about the carbohydrate structure is required to elucidate the mechanism of the effect of anti-adhesion molecules in *E. coli* strains.

Numerous studies have indicated that bovine and human milk protect against infections caused by *E. coli*. Coppa et al. (2006) isolated acid and neutral oligosaccharides from human milk. All fractions inhibited the adhesion of EPEC serotype O119 to Caco-2 cells. Characterization of neutral fractions indicated the presence of fucosylated oligosaccharides. Similarly, isolated and purified human milk oligosaccharides prevented the binding of EPEC strain 2348/69 (serotype O127:H6) to intestinal epithelial cells (HeLa and Hep-2 cells) (MANTHEY et al., 2014). Infant formula containing GOS, were also tested, but did not show anti-adhesion effect, indicating absence of an active component recognized by pathogens.

Martin, Martin-Sosa and Hueso (2002) and Martin-Sosa, Martin and Hueso (2002) studied the potential of human milk oligosaccharides to bind ETEC strains expressing different fimbriae. Sialylated fraction of milk oligosaccharides proved to be efficient at inhibiting hemagglutination mediated by this pathogen. ETEC strains,

expressing K99, F41 and F17 adhesin, exhibit high affinity for $\alpha(2\rightarrow6)$ -sialylated acid. The expression of B23 adhesin exhibit affinity for $\alpha(2\rightarrow3)$ -sialylated isomers and B64 adhesin seem to require *N*-acetylglucosamine for binding. ETEC strains, expressing CFA/I and CFA/II fimbriae, are inhibited by sialylated fraction, however desialylated fractions also inhibit adhesion, requiring only larger quantities. These results indicate that despite the acid residue is involved in the recognition process, it is not alone responsible for the inhibition. Other structures of oligosaccharide can participate in the binding process.

Lane, Mariño, Rudd, et al. (2012) reported that 3'-sialyllactose and a mixture of bovine colostrum oligosaccharides (lactose, 3'-sialyllactosamine, 3'-sialyllactose, 6'-sialyllactosamine, 6'-sialyllactose and disialyllactose) inhibited the *E. coli* O157:H7 adhesion to differentiated HT-29 cells. Maldonado-Gomez et al. (2015) studied different fractions obtained from bovine colostrums that are able to prevent the EPEC strain E2348/69 (serotype O127:H6) attachment to HEP-2 cells. Results showed little difference between the oligosaccharide profiles, with predominance of sialylated trisaccharides. In addition to the carbohydrates, the fractions also contained small peptides, including glycopeptides as glycomacropeptide (GMP), lactoferrin and β -lactoglobulin.

Several milk glyconjugates have also been reported to have anti-adherence activity against different *E. coli* strains (NEWBURG, 1999; PETERSON et al., 2013) including glycomacropeptide (BRUCK et al., 2006), mucins (PARKER et al., 2010), lactoferrin (NAIDU, 1991; TERAGUCHI et al., 1996; KAWASAKI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001) and immunoglobulin (DEMIERRE et al., 1975; ATROSHI et al., 1983; WOLD et al., 1990; SILVA, GIAMPAGLIA, 1992; CAMARA et al., 1994; CARBONARE et al., 1995; DELNERI et al., 1997; FERNANDES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007). Furthermore, nonimmunoglobulin fractions have also been shown to inhibit pathogen binding (HOLMGREN; SVENNERHOLM; AHREN, 1981; ASHKENAZI; MIRELMAN, 1987; ARAÚJO; GIUGLIANO, 2000; PALMEIRA et al., 2001).

Glycoconjugates derived other sources were also evaluated for anti-adhesion capacity. Ramos-Clamont et al. (2007) isolated immunoglobulin from porcine serum. This IgA inhibited hemagglutination of erythrocytes by ETEC K88. It is suggested that the oligosaccharides present in the structure of this glycoprotein is interacting with

the pathogen. Results from glycoprotein-blocking studies indicate that terminal GlcNAc and GalNAc, presents in ovine submaxillary mucin and α_1 -acid glycoprotein, may play a role in the interaction of the K88 adhesin with brush border receptors (ANDERSON; WHITEHEAD; KIM, 1980). Metcalfe et al. (1991) and Erickson et al. (1992) propose that *E. coli* K88 binds to glycoproteins obtained from porcine intestinal brush border and porcine small intestine mucus. In addition, Seignole et al. (1994) proposed that the K88 adhesin recognizes Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc and Fuc α (1 \rightarrow 2)Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc on the pig intestinal receptor and reported that K88ac binding totally disappeared after fucosidase treatment. Galactosylceramide also has been reported to be responsible structure in the recognition of intestinal mucus receptors by the K88 adhesin (BLOMBERG et al., 1993).

Therapeutic effects against *E. coli* K88 have been observed by egg yolk derivatives, suggesting the presence of structures recognized by the pathogen. Jin et al. (1998) isolated egg yolk antibodies capable of decreasing between 84.6 to 97% of ETEC adhesion to intestinal mucus piglet. Sialylglycopeptide, sialyloligosaccharide and its asialooligosaccharides derived from hen egg yolk inhibited the *E. coli* K88 adhesion to Caco-2 cells (SUGITA-KONISHI et al., 2002). Sialylglycopeptide conjugated to carboxymethylcellulose was able to inhibit *E. coli* at a concentration of 50 μ M (SUGITA-KONISHI et al., 2004).

Synthetic oligosaccharide-protein conjugates (neoglycoproteins) obtained by non-enzymatic lactosylation of serum albumin from different species, as porcine serum albumin (PSA)-lactose or bovine serum albumin (BSA)-lactose, can reduce ETEC K88 adherence to mucin *in vitro* (LEDESMA-OSUNA; RAMOS-CLAMONT; VAZQUEZ-MORENO, 2009; SARABIA-SAINZ et al., 2009). Chemically synthesized *N*-acetyllactosamine glycosides covalently coupled to BSA (LacNAc-BSA) or gold nanoparticles impede the EPEC strain E2348/69 (serotype O127:H6) binding to HEp-2, Caco-2 and T84 cells, even reaching 98.5% inhibition in HEp-2 cells (VANMAELE; HEERZE; ARMSTRONG, 1999; HYLAND et al., 2006).

Laparra et al. (2011) synthesized glycoconjugates from galactosylation and lactosylation of β -lactoglobulin and sodium caseinate obtained via Maillard reaction. All glycoconjugates obtained significantly reduced adherence to mucin *E. coli in vitro*. *In vitro* digestion assays have identified galactose as partial responsible to the recognition of glycoconjugates.

Receptors K99 (F5) fimbrial adhesin have a high specificity for *N*-acetylneuraminic acid and *N*-acetylgalactosamine (MORRIS; STEVENS; SOJKA, 1977; LINDAHL; WADSTROM, 1984; LINDAHL, 1989; LINDAHL; CARLSTEDT, 1990). Thereby, several sialic acid conjugates has been described as receptor sites for t fimbriae. This fimbriae seems to recognize sequences NeuGc α 3Gal β 4Glc β (Willemsen and De Graaf, 1993) present in glycolipids (NeuGc-GM₃, N-Glycoly-GM₃ and *N*-glycolulsialoparagloboside) from piglet small intestine (KYOGASHIMA; GINSBURG; KRIVAN, 1989; TENEBERG et al., 1990) and gangliosides (NeuGc-GM₃, NeuGc-GM₂ and NeuGc-GD₁) from calf small intestine (TENEBERG et al., 1994). It is also recognize GM₂ ganglioside derived from newborn meconium (FARIS, LINDAHL; WADSTRÖM, 1980), glycolipids (NeuGcLacCer, NeuGc-GM₃) from equine erythrocyte (SMIT et al., 1984; ONO et al., 1989) and oligosaccharides NeuAc(α 2 \rightarrow 6)GalNAc of human erythrocyte glycoprophin (LINDAHL; WADSTROM, 1984). Mouricout et al. (1990), Mouricout (1991) and Mouricout and Julien (1987) identified bovine plasma glycoproteins composed of several oligosaccharides with at least Neu5Gc or Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)Gal nonreducing terminal sequence. All these structures are at least minimally similar to receptors in the intestinal epithelium used during the process of bacterial adhesion.

ETEC expressing F17 fimbriae recognize receptors located in the mucus and brush border membrane of young calves (SANCHEZ et al., 1993). Adherence to mucus and brush border membranes was restrained by different glycoproteins: fetuin, ovomucin, mucin, hen egg white and cow plasm. Bovine erythrocyte glycoprophin also inhibited hemagglutination of erythrocytes by ETEC F17 (MOURICOUT et al., 1995). The F17 fimbriae interacted specifically with glycosylated units of glycoprophin. Its affinity is affected by GlcNAc bond position, β (1 \rightarrow 3)-linked have high affinity, but sequences of GlcNAc β (1 \rightarrow 3)Gal in internal position in the chain are recognized too.

ETEC expressing CFA/I are mannose resistant (EVANS; EVANS; DUPONT, 1979). Bartus et al. (1985) identified that CFA/I specifically bound to sialic acid present in glycoconjugates. Sialoglycoprotein isolated from human erythrocytes inhibited at low concentrations, hemagglutination by ETEC CFA/I. This glycoprotein contains high levels of sialic acid, corresponding to 25% of the total carbohydrate

present. Other molecules containing sialic acid, ganglioside GM₂, mucin type 2, N-acetylneuraminic acid, also were effective in higher concentrations.

Several fimbriae have been implicated as potentially important in EPEC adhesion and pathogenesis. Among them are the type I fimbriae (KARCH et al., 1987; ELLIOTT; KAPER, 1997). However the role of the EPEC type I fimbriae in human enteric infections is still unclear, since the adhesion usually is mediated by the plasmid-borne type IV fimbriae known as bundle-forming pili (Bfp) (TORRES; ZHOU; KAPER, 2005).

Type I fimbriae are highly specific for mannose residues and several studies reported the ability of D-mannose, methyl α -D-mannoside, manooligosaccharides or oligomannoside-type glycopeptide to inhibit *E. coli* adhesion to intestinal cells (RIVIER; DAREKAR, 1975; OFEK, MIRELMAN; SHARON, 1977; OFEK; BEACHEY, 1978; NEESER; KOELLREUTTER; WUERSCH, 1986; LEUSCH et al., 1991; AL-GHAZZEWI; TESTER, 2014). Other monosaccharides, as fucose, glucose, D-fructose, N-acetylmannosamine (SALIT; GOTSCHLICH, 1977; ASHKENAZI; MIRELMAN, 1984) and fructoligosaccharides (NAUGHTON; MIKKELSEN; JENSEN, 2001) also been described to present anti-adhesion ability.

EHEC expressed a series of fimbrial proteins (Lpf1, Lpf2, curli, ECP, F9, ELF, Sfp, HCP, and type 1 fimbriae) related to the process of adhesion and colonization of different surfaces (MCWILLIAMS; TORRES, 2014). The anti-adhesion capacity of glycoproteins derived from mucin has been investigated. Ovomucin glycopeptides (OGP), obtained from hydrolysis enzymatic of hen egg ovomucin, binds to EHEC (KOBAYASHI et al., 2004). Ovomucin is a highly glycosylated protein containing different carbohydrates. It consists mainly of N-acetylneuraminic acid, followed by N-acetylhexosamines and galactose. Treatment with periodate indicated that the bacterium binds to OGP carbohydrate portions. Treatment with neuraminidase abolished binding capacity to the pathogen, indicating that sialic acid has an important role in the recognition of the molecule.

Sajjan and Forstner (1990a) found one of six strains of EHEC O157:H7, called CL-49, which binds to purified rat intestinal mucin by fimbriae expression of type 1. Mucin purified impeded hemagglutination caused by EHEC, in minimal concentration, and was 7-fold more potent than the native mucin. Its composition includes GlcNAc, GalNAc, galactose, fucose, mannose and sialic acid (SAJJAN;

FORSTNER, 1990B). Deglycosylation abolished the activity of the molecule, demonstrating that CL-49 exhibits specificity to the glycans.

1.5.4 Alternatives to Control Other Pathogens

Studies of other gram-negative bacteria related to enteric diseases and zoonosis have been described in smaller number. Among the main genres are *Shigella*, *Yersinia* and *Vibrio*.

Guhathakurta, Sasmal and Datta (1992) demonstrated that *Shigella dysenteriae* and *S. flexneri* are sensitive to fucose, *N*-acetylneuraminic acid and *N*-acetylmannosamine. Glucose, mannose, fructose and α -methylmannoside also reduced binding to intestinal cell and hemagglutination of erythrocytes by *S. flexneri* (OLD, 1972; ASHKENAZI; MIRELMAN, 1984). Polysaccharides obtained from plantain (*Musa* spp.), containing uronic acids, glucose, and mannose (Roberts et al., 2013), guinea pig mucus (DINARI et al., 1986) and human milk glycoproteins (WILLER; LIMA; GIUGLIANO, 2004; BRUCK et al., 2006) inhibited adherence of different strains of *Shigella* to HeLa cells and Caco-2.

Izhar et al. (1982) isolated a lipopolysaccharide (LPS) from *S. flexneri* able to reduce bacterial adhesion to pig colonic cells. It is composed of rhamnose, glucose and *N*-acetylglucosamine. Proteins portions were also identified. Periodate oxidation and saponification affect the inhibition capacity, indicating that a carbohydrate moiety of LPS is recognized by the adhesin of the bacteria.

Jensen and Paerregaard (1991) identified human and bovine milk fractions able to reduce the attachment of different strains of *Yersinia enterocolitica* to brush border vesicle and epithelial cells (IPI-2I). It is suggested that present nonimmunoglobulin components are responsible for the reduction. Paerregaard et al. (1991) and Mantle et al. (1989) identified that mucus from rabbit and mucin decrease adhesion by *Y. enterocolitica* to brush border cell. It is unknown which adhesins mediate the binding of *Y. enterocolitica* to mucin, however Mantle and Husar (1993) found that galactose, *N*-acetylgalactosamine and lactose decrease this connection. Additionally, Mantle and Husar (1994) purified oligosaccharides present in rabbit mucin. Results of treatments of mucin with protease, periodate oxidation and trifluoromethanesulfonic acid allowed to evidence that *N*-acetylgalactosamine, either alone or with galactose attached, is closely involved in bacterial binding.

Vibrio cholerae El Tor and Classic has been reported to be sensitive to D-mannose, L-fucose and D-fructose (JONES; FRETER, 1976; BHATTACHARJEE; SRIVASTAVA, 1978; HANNE; FINKELSTEIN, 1982; EHARA et al., 1987; SANCHEZ, JONSON, 1990). Ehara et al. (1991) showed that D-glucose and *N*-acetylglucosamine also inhibit hemagglutination of erythrocytes by *V. cholerae* O1 fimbriate.

Human milk inhibits hemagglutination of chicken erythrocytes by *V. cholerae* (HOLMGREN; SVENNERHOLM; AHREN, 1981; HOLMGREN; SVENNERHOLM; LINDBLAD, 1983). Results suggest that free oligosaccharides and high molecular weight glycoproteins containing fucose, are responsible for inhibition of classical strains. For El Tor vibrios glycoproteins containing mannose mediated inhibition. Fractions containing glycolipids were not effective. Similar results were reported by Coppa et al. (2006).

1.6 CONCLUSIONS

Uncontrolled and excessive usage of antibiotics has led to a wide range of environmental, economic and public health problems. Thus, the identification and development of compounds that mimic natural receptors, allowing the elimination of pathogens without generating resistance, is seen as a promising strategy opposite the context of the increasing incidence of resistant strains worldwide.

In recent years, numerous studies have been published proposing alternatives to the antibiotics use in control of enteropathogens. However, there are still inconsistencies regarding its practical use. More information is needed to elucidate the exact mechanism of action and receptors structures involved in bacterial adhesion process. It should be noted that the central target of most previous studies involving enteropathogen, does not include the two main genera involved in foodborne illness (*Campylobacter* and *Salmonella*), extra reason to justify the need for more research and involvement of other stakeholders.

There is no way back in time, the consequences of rampant use of antibiotics is reality. We urgently need to create firm alternatives that result in benefits for the future and minimize the consequences of the past still present.

REFERENCES

- AARESTRUP, F. M. Chapter 1 - Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. In: SØRENSEN, J. T.; JENSEN, B. B. (Ed.) **Beyond Antimicrobial Growth Promoters in Food Animal Production**. Denmark: Danish Institute of Agricultural Sciences, 2002. p. 9-16.
- _____. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 271-281, 2005.
- AARESTRUP, F. M. et al. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2054-2059, 2001.
- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 8, p. 639-644, 1999.
- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, n. 5, p. 733-750, 2008.
- ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. BOARD-INVITED REVIEW: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 3189-3218, 2011.
- AGERSØ, Y. et al. **DANMAP 2013 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark**. Copenhagen: Statens Serum Institute, National Veterinary Institute, National Food Institute, 2014.
- AGUNOS, A. et al. Effect of dietary β 1–4 mannanose in the prevention of *Salmonella enteritidis* infection in broilers. **British Poultry Science**, v. 48, n. 3, p. 331-341, 2007.
- AJISAKA, K.; TOBA, T. **Anti-Infectious Disease Agent**. JP2002226496, Ago. 14, 2002.
- AL-GHAZZEWI, F. H.; TESTER, R. F. Inhibition of the adhesion of *Escherichia coli* to human epithelial cells by carbohydrates. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2014.
- ALANIS, A. J. Resistance to Antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Targeting virulence to prevent infection: to kill or not to kill? **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 4, p. 483-489, 2004.

ALEMAYEHU, A. Review on emerging and re-emerging bacterial zoonotic diseases. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v. 7, n. 4, p. 76-186, 2012.

ALEMKA, A. et al. Purified chicken intestinal mucin attenuates *Campylobacter jejuni* pathogenicity *in vitro*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 898-903, 2010.

ALLEN, H. K. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. **Current Opinion in Microbiology**, v. 19, p. 25-29, 2014.

ALLEN, H. K. et al. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 114-119, 2013.

ALP, G. et al. The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells *in vitro*. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 11, p. 658-665, 2010.

AMACHAWADI, R. G. et al. Selection of fecal enterococci exhibiting tcrb-mediated copper resistance in pigs fed diets supplemented with copper. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5597-5603, 2011.

ANDERSEN, C. T. et al. **NORM/NORM-VET 2013. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway**. Tromsø/Oslo: Univ. Hosp. of North Norway, Norwegian Veterinary Institute, Norwegian Institute of Public Health, 2014.

ANDERSON, A. D. et al. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 4, p. 373-379, 2003.

ANDERSON, M. J.; WHITEHEAD, J. S.; KIM, Y. S. Interaction of *Escherichia coli* K88 antigen with porcine intestinal brush border membranes. **Infection and Immunity**, v. 29, n. 3, p. 897-901, 1980.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 901-911, 2011.

ANGULO, F. J.; NUNNERY, J. A.; BAIR, H. D. Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 23, n. 2, p. 485-496, 2004.

APVMA. **Quantity of antimicrobial products sold for veterinary use in Australia**. Kingston: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, 2014.

ARASON, V. A. et al. Clonal spread of resistant Pneumococci despite diminished antimicrobial use. **Microbial Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 187-192, 2002.

ARAÚJO, A. N. D.; GIUGLIANO, L. G. Human milk fractions inhibit the adherence of diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) to HeLa cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, n. 1, p. 91-94, 2000.

ASHKENAZI, S.; MIRELMAN, D. The effect of postnatal age on the adherence of *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* 0124, and *E. coli* 0128 to guinea pig intestinal Cells. **Pediatric Research**, v. 18, n. 12, p. 1366-1371, 1984.

_____. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits the adherence of certain enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to guinea pig intestinal tract. **Pediatric Research**, v. 22, n. 2, p. 130-134, 1987.

ASOA. **Antimicrobial resistance - why the irresponsible use of antibiotics in agriculture must stop**. 2014. Disponível em: < <http://www.ciwf.org.uk/media/5502183/alliance-to-save-our-antibiotics-briefing-25-june-2014.pdf> >. Acesso em: 15/02/2015.

ASPEVALL, O. et al. **SWEDRES - SVARM 2013. Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance in Sweden**. Uppsala: Public Health Agency of Sweden, National Veterinary Institute, 2014

ATROSHI, F. et al. Fat globule membrane of sow milk as a target for adhesion of K88-positive *Escherichia coli*. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. v. 6, p. 235-245, 1983.

ATTERBURY, R. J. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 601-612, 2009.

AUSTIN, D. J.; KRISTINSSON, K. G.; ANDERSON, R. M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 3, p. 1152-1156, 1999.

BADIA, R. et al. β -Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* modulate the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, p. 368-376, 2012.

_____. Oligosaccharide structure determines prebiotic role of β -galactomannan against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium *in vitro*. **Gut Microbes**, v. 4, n. 1, p. 72-75, 2013.

BAILLON, M.L.; GIFFARD, C. J. **Treatment of Infections in Animals**. WO2001065949, Sep. 13, 2001.

BAQUERO, F. et al. Antibiotic-selective environments. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. Supplement 1, p. S5-S11, 1998.

BARBERÀ, J. B. D.; SANZ, I. B. **Natural gum-based premix for animal feed**. WO2003101219, Dec. 11, 2003.

BARBERÀ, J. B. D. et al. **An enzymatic pre-mixture against gram-negative bacteria colonization in the animal intestinal tract**. EP2110024, Oct. 21, 2009a.

_____. **An enzymatic pre-mixture against gram-negative bacteria colonization in the animals intestinal tract.** WO2009144070, Dec. 3, 2009b.

BARBOSA, L. N. et al. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 725-728, 2009.

BARDIAU, M.; SZALO, M.; MAINIL, J. G. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. **Veterinary Research**, v. 41, n. 5, p. 57, 2010.

BARLOW, M.; HALL, B. G. Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. **Journal of Molecular Evolution**, v. 55, n. 3, p. 314-321, 2002.

BARTLEY, E. E.; FOUNTAINE, F. C.; ATKESON, F. W. The effects of an APF concentrate containing aureomycin on the growth and well-being of young dairy calves. **Journal of Animal Science**, v. 9, n. 4, p. 646-647, 1950.

BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 2, p. 279-299, 2000.

BARTUS, H. et al. Indications that the erythrocyte receptor involved in enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment is a sialoglycoconjugate. **Journal of clinical microbiology**, v. 21, n. 6, p. 951-954, 1985.

BAURHOO, B.; GOLDFLUS, F.; ZHAO, X. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2, p. 133-137, 2009.

BAURHOO, B. et al. Cecal populations of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* populations after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poultry Science**, v. 86, n. 12, p. 2509-2516, 2007.

BECKER, P. M.; GALLETTI, S. Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 11, p. 2026-2035, 2008.

BECKER, P. M. et al. Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2686-2696, 2007.

_____. *In vitro* inhibition of ETEC K88 adhesion by pea hulls and of LT enterotoxin binding by faba bean hulls. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 1121-1126, 2012.

BEHRAVESH, C. B.; WILLIAMS, I. T.; TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens and problems: expanding prevention efforts before slaughter or harvest. In: INSTITUTE OF MEDICINE. **Improving food safety through a One Health approach**. Washington: National Academies Press, 2012. cap. A14, p. 307-330.

- BELL, B. G. et al. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 13, 2014.
- BENGTSSON, B. et al. **Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM) 2000**. Uppsala: National Veterinary Institute Uppsala, 2001.
- BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 2012.
- BERENDS, B. R. et al. Veterinary public health: Human health hazards associated with the administration of antimicrobials to slaughter animals. **Veterinary Quarterly**, v. 23, n. 1, p. 10-21, 2001.
- BEZANSON, G. S.; KHAKHRIA, R.; BOLLEGRAAF, E. Nosocomial outbreak caused by antibiotic-resistant strain of *Salmonella typhimurium* acquired from dairy cattle. **Canadian Medical Association Journal**, v. 128, n. 4, p. 426-427, 1983.
- BHATTACHARJEE, J. W.; SRIVASTAVA, B. S. Mannose-sensitive haemagglutinins in adherence of *Vibrio cholerae* eltor to intestine. **Journal of General Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 407-410, 1978.
- BHULLAR, K. et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34953, 2012.
- BIGGS, P.; PARSONS, C. M. The effects of Grobiotic-P on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, v. 87, n. 9, p. 1796-1803, 2008.
- BLAGER, F. et al. **DANMAP 98 - Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and human in Denmark**. Copenhagen: Statens Serum Institut, Danish Veterinary & Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Laboratory, 1999.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.
- BLANCO, J.; GONZALEZ, E. A.; ANADON, R. Colonization antigens and haemagglutination patterns of human *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 316-326, 1985.
- BLANCOU, J. et al. Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 507-522, 2005.
- BLOMBERG, L. et al. Piglet ileal mucus contains protein and glycolipid (galactosylceramide) receptors specific for *Escherichia coli* K88 fimbriae. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 6, p. 2526-2531, 1993.
- BODE, L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, v. 22, p. 1147-1162, 2012.

BOERLIN, P.; WHITE, D. G. Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Ed.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5 ed. Iowa: John Wiley & Sons, 2013. cap. 3, p. 21-40.

BOERLIN, P. et al. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in Enterococci from Pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4193-4195, 2001.

BOROWSKY, L.; CORCAO, G.; CARDOSO, M. Mannan oligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 458-464, 2009.

BOSCH, F.; ROSICH, L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. **Pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 171-179, 2008.

BRENNAN, J. et al. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 82, n. 3, p. 360-363, 2003.

BRUCK, W. M. et al. The effects of alpha-lactalbumin and glycomacropeptide on the association of CaCo-2 cells by enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 158-162, 2006.

BRUGGEMAN, G.; DESCHEPPER, K. **Tri and tetra-oligo-saccharides suitable as agglutination agents for enteric pathogens**. WO2007138047, Dec. 6, 2007.

_____. **Tri- and tetra-oligo-saccharides suitable as agglutination agents for enteric pathogens**. US8729051, May 20, 2014.

BRUINSMA, N. et al. Influence of population density on antibiotic resistance. **J Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 385-390, 2003.

BURGER, O. et al. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 295-301, 2000.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894-896, 2011.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 175-188, 2003.

BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, M. A.; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 10, p. 571-591, 2013.

BYRNE, C. M.; CLYNE, M.; BOURKE, B. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro. **Microbiology**, v. 153, p. 561-569, 2007.

CAIN, C. Rediscovering antibiotics. **SciBX: Science-Business eXchange**, v. 5, n. 46, 2012.

CALLAWAY, T. R. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 217-225, 2008.

CALLESEN, J. Effects of termination of AGP-use on pig welfare and productivity. In: International Invitational Symposium: Beyond Antibiotic Growth Promoters in Food Animal Production, 2002, Denmark. **Abstracts...** Foulum: Danish Veterinary Institute and the Danish Institute of Agricultural Science, 2002. p. 6.

CAMARA, L. M. et al. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to HeLa cells by human colostrum: detection of specific sIgA related to EPEC outer-membrane proteins. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 103, n. 3, p. 307-310, 1994.

CANTAS, L.; SUER, K. Review: The important bacterial zoonoses in "one health" Concept. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 144, 2014.

CANTÓN, R. et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, France, v. 14, n. Suppl 1, p. 144-153, 2008.

CARBONARE, S. B. et al. Inhibition of HEp-2 Cell invasion by enteroinvasive *Escherichia coli* by human colostrum IgA. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 108, n. 2, p. 113-118, 1995.

CASAL, J. et al. Factors associated with routine mass antimicrobial usage in fattening pig units in a high pig-density area. **Veterinary Research**, v. 38, n. 3, p. 481-492, 2007.

CASEWELL, M. et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 159-161, 2003.

CASTANON, J. I. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, 2007.

CAVACO, L. M.; AARESTRUP, F. M. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. In: KRCMÉRY, V. (Ed.). **Microbial Drug Resistance**. Slovakia: Future Medicine, 2013. p. 136-158.

CDC. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2014a.

_____. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2012: Annual Report**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2014b.

CEGELSKI, L. et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 17-27, 2008.

CHAIN, E. et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. **The Lancet**, v. 236, n. 6104, p. 226-228, 1940.

CHANTZIARAS, I. et al. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 827-834, 2014

CHESSA, D. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2)fucose residues in the cecal mucosa. **Molecular Microbiology**, England, v. 71, n. 4, p. 864-875, 2009.

CHOPRA, I. et al. Treatment of health-care-associated infections caused by gram-negative bacteria: a consensus statement. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 133-139, 2008.

CINCO, M. et al. Evidence for l-fucose (6-deoxy-l-galactopyranose)-mediated adherence of *Campylobacter* spp. to epithelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 21, n. 3, p. 347-351, 1984.

CLEGG, S.; GERLACH, G. F. Enterobacterial fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 3, p. 934-938, 1987.

COATES, A. R. M.; HALLS, G.; HU, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 1, p. 184-194, 2011.

COATES, M. E.; DAVIES, M. K.; KON, S. K. The effect of antibiotics on the intestine of the chick. **British Journal of Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 110-119, 1955.

COATES, M. E. et al. Mode of action of antibiotics in stimulating growth of chicks. **Nature**, v. 168, n. 4269, p. 332, 1951.

_____. A comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. **British Journal of Nutrition**, v. 17, p. 141-150, 1963.

COGLIANI, C.; GOOSSENS, H.; GREKO, C. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. **Microbe**, v. 6, n. 6, p. 274, 2011.

COLLIGNON, P.; ANGULO, F. J. Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli*: Food for Thought. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 1, p. 8-10, 2006.

COLLINS, J.; WALL, P. Food safety and animal production systems: controlling zoonoses at farm level. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties**, v. 23, n. 2, p. 685-700, 2004.

CONGRESS, U. S. **Impacts of Antibiotic-Resistant Bacteria: Thanks to Penicillin - He will come home!** Washington: Government Printing Office- Office of Technology Assessment, 1995.

COOPER, M. A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 32, 2011.

COPPA, G. V. et al. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella fytis*. **Pediatric Research**, v. 59, p. 377-382, 2006.

COSTA, E. et al. Non-therapeutic administration of a model antimicrobial growth promoter modulates intestinal immune responses. **Gut Pathogens**, v. 3, n. 1, p. 14, 2011.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, 2013.

CRIM, S. M. et al. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**, v. 63, n. 15, p. 328-332, 2014.

CUNHA, J. et al. Effect of aureomycin and other antibiotics on the pig. **Journal of Animal Science**, v. 9, n. 4, p. 653-654, 1950.

DANTAS, G.; SOMMER, M. O. A. How to fight back against antibiotic resistance. **American Scientist**, v. 102, n. 1, p. 42-51, 2014.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DAVIES, J.; SPIEGELMAN, G. B.; YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 445-453, 2006.

DAVISON, J. Genetic Exchange between bacteria in the environment. **Plasmid**, v. 42, n. 2, p. 73-91, 1999.

DAY, C. J. et al. Differential carbohydrate recognition by *Campylobacter jejuni* strain 11168: influences of temperature and growth conditions. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4927, 2009.

DELNERI, M. T. et al. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by colostrum and milk from mothers delivering low-birth-weight neonates. **European Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 6, p. 493-498, 1997.

DEMIERRE, G. et al. Adherence of pathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells isolated from the intestinal mucosa of the rabbit, inhibiting effect of hyperimmune bovine colostrum and of various carbohydrates. **Pathologia Et Microbiologia**, v. 42, n. 3, p. 137-146, 1975.

- DER MEULEN, J. V.; PANNEMAN, H.; JANSMAN, A. J. M. Effect of pea, pea hulls, faba beans and faba bean hulls on the ileal microbial composition in weaned piglets. **Livestock Science**, v. 133, n. 1–3, p. 135-137, 2010
- DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.
- DINARI, G. et al. Effect of guinea pig or monkey colonic mucus on *Shigella* aggregation and invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri* 1b and 2a. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 3, p. 975-978, 1986.
- DJENANE, D. et al. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 6, p. 505-515, 2011.
- DOWELL, S. F.; SCHWARTZ, B.; PHILLIPS, W. R. Appropriate use of antibiotics for URIs in children: Part II. Cough, pharyngitis and the common cold. The Pediatric URI Consensus Team. **American family physician**, v. 58, n. 6, p. 1335-1342, 1998.
- DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 70, n. 1, p. 1-10, 1939a.
- _____. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 70, n. 1, p. 11-17, 1939b.
- DUBOS, R. J.; CATTANEO, C. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: III. Preparation and activity of a protein-free fraction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 70, n. 3, p. 249-256, 1939.
- DZIDIC, S.; BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 6, p. 519-526, 2003.
- DÉ, E. et al. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. **Molecular Microbiology**, England, v. 41, n. 1, p. 189-198, 2001.
- EC. **Press release IP/05/1687 - Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect**. Brussels: European Commission, 2005.
- ECDC/EMA. **Joint technical report - The bacterial challenge: time to react**. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) & European Medicines Agency (EMA), 2009.
- EFSA. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (*Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* and *Norovirus* in bulb and stem vegetables, and carrots). **European Food Safety Authority Journal**, v. 12, n. 12, p. 3937-4028, 2014.

_____. **Press Release: *Salmonella* and *Campylobacter* show significant levels of resistance to common antimicrobials in humans and animals.** Parma, 2015. Disponível em: < <http://www.ecdc.europa.eu/en/press/Press%20Releases/antimicrobial%20resistance-zoonotic-bacteria-EU-summary-report-press-release-2013.pdf> >. Acesso em: 02/03/2015.

EFSA/ECDC. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 2, p. 178, 2015a.

_____. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 3991-4153, 2015b.

EHARA, M. et al. Purification and partial characterization of fimbriae of *Vibrio cholerae* O1. **Vaccine**, v. 5, n. 4, p. 283-288, 1987.

_____. Selective Induction of Fimbriate *Vibrio cholerae* O1. **Tropical Medicine**, v. 33, n. 4, p. 93-107, 1991.

EL-KHALEK, E. A. et al. Indirect evidence for microbiota reduction through dietary mannanoligosaccharides in the pigeon, an avian species without functional caeca. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 1084-1090, 2012.

ELAM, J. F.; GEE, L. L.; COUCH, J. R. Effect of feeding penicillin on the life cycle of the chick. **Experimental Biology and Medicine**, v. 77, n. 2, p. 209-213, 1951.

ELLIOTT, S. J.; KAPER, J. B. Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 23, n. 2, p. 113-118, 1997.

EMA. **Trends in the sales of veterinary antimicrobial agents in nine European countries. Reporting period: 2005-2009.** European Medicines Agency. London, 2011.

EMA/ESVAC. **Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012.** London: European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2014.

ENGBERG, J. et al. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 24-34, 2001.

_____. Quinolone-resistant *Campylobacter* Infections: Risk Factors and Clinical Consequences. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1056-1063, 2004.

ERICKSON, A. K. et al. Identification of two porcine brush border glycoproteins that bind the K88ac adhesin of *Escherichia coli* and correlation of these glycoproteins with the adhesive phenotype. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 3, p. 983-988, 1992.

EVANS, D. J.; EVANS, D. G.; DUPONT, H. L. 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.

EVANS, D. J. J.; EVANS, D. G. *Escherichia coli* in diarrheal disease. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4 ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. cap. 25.

FAJARDO, A. et al. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1619, 2008.

FARIS, A.; LINDAHL, M.; WADSTRÖM, T. Gm2-like glycoconjugate as possible erythrocyte receptor for the Cfa/I and K 99 haemagglutinins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 7, n. 3, p. 265-269, 1980.

FDA. **Drug Use Review**. Rockville: Food and Drug Administration - Department of Health and Human Services, Office of Surveillance and Epidemiology, 2012.

_____. **2010 Summary Report - Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food - Producing Animals**. Rockville: Food and Drug Administration - Department of Health and Human Services, 2014a.

_____. **2012 Summary Report - Antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals**. Rockville: Food and Drug Administration - Department of Health and Human Services, 2014b.

FEIGHNER, S. D.; DASHKEVICZ, M. P. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 331-336, 1987.

FERBER, D. Antibiotic resistance. WHO advises kicking the livestock antibiotic habit. **Science**, v. 301, n. 5636, p. 1027, 2003.

FERNANDES, R. M. et al. Inhibition of enteroaggregative *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by secretory immunoglobulin A from human colostrum. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, n. 7, p. 672-678, 2001.

FERNANDEZ, F.; HINTON, M.; VAN GILS, B. Evaluation of the effect of mannan-oligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella Enteritidis* colonization in broiler chicks. **Avian Pathology**, v. 29, p. 575-581, 2000.

_____. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. **Avian Pathology**, v. 31, n. 1, p. 49-58, 2002.

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.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929.

_____. **Nobel Lecture: Penicillin**. 1945. Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html >. Acesso em: 15/01/2015.

FORSLUND, K. et al. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. **Genome Research**, v. 23, n. 7, p. 1163-1169, 2013.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. Suppl 1, p. S15-S28, 2010.

GANAN, M. et al. Inhibition by yeast-derived mannoproteins of adherence to and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 55-59, 2009.

_____. Inhibition by pectic oligosaccharides of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 181-185, 2010.

GANNER, A. et al. Quantitative evaluation of *E. coli* F4 and *Salmonella typhimurium* binding capacity of yeast derivatives. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 62, 2013.

_____. 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, n. 2, p. 168-174, 2010.

GARAU, J. et al. Antibiotic stewardship challenges in the management of community-acquired infections for prevention of escalating antibiotic resistance. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 245-253, 2014.

GASKINS, H. R.; COLLIER, C. T.; ANDERSON, D. B. Antibiotics as growth promotants: mode of action. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 29-42, 2002.

GEBREYES, W. A.; ALTIER, C. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2813-2822, 2002.

GESER, N. et al. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in swine and cattle at slaughter in Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 3, p. 446-449, 2011.

GHOSH, S. et al. Interaction of a rat intestinal brush border membrane glycoprotein with type-1 fimbriae of *Salmonella typhimurium*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 158, n. 2, p. 125-131, 1996.

GIBBONS, R. A.; JONES, G. W.; SELLWOOD, R. An attempt to identify the intestinal receptor for the K88 adhesin by means of a haemagglutination inhibition test using glycoproteins and fractions from sow colostrum. **Journal of General Microbiology**, v. 86, n. 2, p. 228-240, 1975.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIGUÈRE, S.; ABRAMS-OGG, A. C. G.; KRUTH, S. A. Prophylactic Use of Antimicrobial Agents, and Antimicrobial Chemotherapy for the Neutropenic Patient. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. (Ed.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5 ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2013. cap. 21.

GONZALEZ-ORTIZ, G. et al. Screening of extracts from natural feed ingredients for their ability to reduce enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 adhesion to porcine intestinal epithelial cell-line IPEC-J2. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 494-499, 2013.

_____. Screening the ability of natural feed ingredients to interfere with the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 to the porcine intestinal mucus. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 633-642, 2014.

GRAHAM, J. P.; BOLAND, J. J.; SILBERGELD, E. Growth Promoting Antibiotics in Food Animal Production: An Economic Analysis. **Public Health Reports**, v. 122, n. 1, p. 79-87, 2007.

GRANGE, P. A. et al. Characterization of the carbohydrate moiety of intestinal mucin-type sialoglycoprotein receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1613-1621, 1998.

_____. Identification of an intestinal neutral glycosphingolipid as a phenotype-specific receptor for the K88ad fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 165-172, 1999.

_____. Evaluation of receptor binding specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial adhesin variants using porcine serum transferrin and glycosphingolipids as model receptors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2336-2343, 2002.

GRAVE, K. et al. Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 75, n. 1-2, p. 123-132, 2006.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guide to Antimicrobial Use in Animals**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008.

GUHATHAKURTA, B.; SASMAL, D.; DATTA, A. Adhesion of *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella flexneri* to guinea-pig colonic epithelial cells in vitro. **Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 403-405, 1992.

GULLBERG, E. et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. e1002158, 2011.

GUPTA, K. et al. Cranberry products inhibit adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial Cells. **The Journal of Urology**, v. 177, n. 6, p. 2357-2360, 2007.

GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 531-541, 1997.

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.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 2, p. 111-123, 2004.

HANNE, L. F.; FINKELSTEIN, R. A. Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, v. 36, n. 1, p. 209-214, 1982.

HANNING, I. B.; NUTT, J. D.; RICKE, S. C. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 635-648, 2009.

HARRISON, E. M. et al. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel mecA homologue mecC. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 4, p. 509-515, 2013.

HAWKEY, P. M. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. Suppl 1, p. 159-165, 2008.

HEDE, K. Antibiotic resistance: An infectious arms race. **Nature**, v. 509, n. 7498, p. S2-S3, 2014.

HEERZE, L. D.; ARMSTRONG, G. D. **Administering oligosaccharide**. US6069137, May 30, 2000.

HEILIG, S.; LEE, P.; BRESLOW, L. Curtailing antibiotic use in agriculture: It is time for action: this use contributes to bacterial resistance in humans. **Western Journal of Medicine**, v. 176, n. 1, p. 9-11, 2002.

HERMES, R. G. et al. Influence of dietary ingredients on *in vitro* inflammatory response of intestinal porcine epithelial cells challenged by an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88). **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, p. 479-488, 2011.

_____. Casein glycomacropeptide in the diet may reduce *Escherichia coli* attachment to the intestinal mucosa and increase the intestinal lactobacilli of early

weaned piglets after an enterotoxigenic *E. coli* K88 challenge. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 6, p. 1001-1012, 2013.

_____. Effect of dietary level of protein and fiber on the productive performance and health status of piglets. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3569-3577, 2009.

HOELZER, K. et al. The prevalence of multidrug resistance is higher among bovine than human *Salmonella enterica* serotype Newport, Typhimurium Isolates in the United States but differs by serotype and geographic Region. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p. 5947-5959, 2010.

HOFACRE, C. L. et al. Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control *Necrotic enteritis*. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 1, p. 60-64, 2003

HOFSHAGEN, M. et al. **NORM-VET 1999. Usage of antimicrobial agents in animals and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from animals, feed, and food in Norway 1999**. Oslo: The Norwegian Zoonosis Centre, National Institute of Public Health, National Veterinary Institute, Norwegian School of Veterinary Science/VETLIS, 2000.

HOGAN, D.; KOLTER, R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 5, n. 5, p. 472-477, 2002.

HOLMGREN, J.; SVENNERHOLM, A. M.; AHREN, C. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, v. 33, n. 1, p. 136-141, 1981.

HOLMGREN, J.; SVENNERHOLM, A. M.; LINDBLAD, M. Receptor-like glycoconjugates in human milk that inhibit classical and El Tor *Vibrio cholerae* cell adherence (hemagglutination). **Infection and Immunity**, v. 39, n. 1, p. 147-154, 1983.

HOSOI, Y. et al. Sales of veterinary antimicrobial agents for therapeutic use in food-producing animal species in Japan between 2005 and 2010. **Revue Scientifique Et Technique/ Office International Des Épizooties**, v. 33, n. 3, p. 1-18, 2014.

HOWARD, S. J. et al. Antibiotic resistance: global response needed. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1001-1003, 2013.

HUE, O. et al. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 992-999, 2010.

HUGHES, V. M.; DATTA, N. Conjugative plasmids in bacteria of the pre-antibiotic era. **Nature**, v. 302, n. 5910, p. 725-726, 1983.

HUME, M. E. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. **Poultry Science**, v. 90, n. 11, p. 2663-2669, 2011.

HUTTNER, A. et al. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 2, p. 31, 2013.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. V. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 182-188, 2011.

HYLAND, R. M. et al. N-Acetyllactosamine conjugated to gold nanoparticles inhibits enteropathogenic *Escherichia coli* Colonization of the epithelium in human intestinal biopsy specimens. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 5419-5421, 2006.

_____. Basis for N-acetyllactosamine-mediated inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* localized adherence. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 669-675, 2006.

IDSA. **Bad bugs, no drugs**. Alexandria: Infectious Diseases Society of America, 2004.

ISHIHARA, N. et al. Preventive effect of partially hydrolyzed guar gum on infection of *Salmonella enteritidis* in young and laying hens. **Poultry Science**, v. 79, n. 5, p. 689-697, 2000.

IZHAR, M.; NUCHAMOWITZ, Y.; MIRELMAN, D. Adherence of *Shigella flexneri* to guinea pig intestinal cells is mediated by a mucosal adhesion. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 3, p. 1110-1118, 1982.

JACELA, J. Y.; DEROUCHÉY, J. M.; TOKACH, M. D. Feed additives for swine: Fact sheets - high dietary levels of copper and zinc for young pigs, and phytase. **Journal of Swine Health and Production**, v. 18, n. 2, p. 87-91, 2010.

JACKSON, M. E. et al. Beneficial effect of beta-mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 759-763, 2003.

JACOBS, C. M.; PARSONS, C. M. The effect of Grobiotic-P combined with yeast cell wall and gluconic acid on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, v. 88, n. 11, p. 2360-2367, 2009.

JAGANNATHA, H. M. et al. Identification of carbohydrate structures as receptors for localised adherent enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 11, p. 259-268, 1991.

JENSEN, O. M.; PAERREGAARD, A. Inhibition of plasmid-encoded adhesion of *Yersinia enterocolitica* by non-immunoglobulin fraction of human milk. **APMIS**, v. 99, n. 7-12, p. 657-660, 1991.

JIN, L. et al. *In vitro* inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 313-321, 1998.

JOHNY, A. K. et al. Prophylactic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Salmonella enteritidis* colonization in commercial broiler chicks. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 4, p. 722-727, 2009.

_____. Caprylic acid reduces *Salmonella enteritidis* populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically. **Poultry Science**, v. 91, n. 7, p. 1686-1694, 2012.

JONES, F. T.; RICKE, S. C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 613-617, 2003.

JONES, G. W.; FRETER, R. Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 14, n. 1, p. 240-245, 1976.

KARCH, H. et al. Serological response to type 1-like somatic fimbriae in diarrheal infection due to classical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 2, n. 6, p. 425-434, 1987.

KASTNER, U. et al. Acid oligosaccharides as the active principle of aqueous carrot extracts for prevention and therapy of gastrointestinal infections. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 152, n. 15-16, p. 379-381, 2002.

KAWASAKI, Y. et al. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to host cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 348-354, 2000.

KELLY, L. et al. Animal growth promoters: to ban or not to ban? A risk assessment approach. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 3, p. 205-212, 2004.

KIERS, J. L. et al. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 311-315, 2002.

KISIELA, D. et al. Functional characterization of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Microbiology**, v. 152, p. 1337-1346. 2006.

KLINGEBERG, M. et al. **Use of carbohydrates for eliminating intestinal infections in animals**. EP1698341, Sep. 20, 2006.

_____. **Verwendung von kohlenhydraten zur beseitigung von darminfektionen bei tieren**. WO2002060452, Mar. 20, 2003.

KNARREBORG, A. et al. Dietary antibiotic growth promoters enhance the bioavailability of alpha-tocopheryl acetate in broilers by altering lipid absorption. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1487-1492, 2004.

KOBAYASHI, K. et al. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 18, p. 5740-5746, 2004.

KONKEL, M. E. et al. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 55-71, 2001.

KORHONEN, T. K. et al. Characterization of type 1 pili of *Salmonella typhimurium* LT2. **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 2, p. 800-805, 1980.

KROSS, R. D. **Composition and method for reducing the colonization of animal intestines by *Salmonella* and other bacterial pathogens**. US6126961, Oct. 3, 2000.

KRUSE, H.; SØRUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4015-4021, 1994.

KYOGASHIMA, M.; GINSBURG, V.; KRIVAN, H. C. *Escherichia coli* K99 binds to N-glycolylsialoparagloboside and N-glycolyl-GM3 found in piglet small intestine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 270, p. 391-397, 1989.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1471-1485, 2005.

LANDERS, T. F. et al. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4-22, 2012.

LANE, J. A.; MARIÑO, K.; NAUGHTON, J. et al. Anti-infective bovine colostrum oligosaccharides: *Campylobacter jejuni* as a case study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 182-188, 2012.

LANE, J.A.; MARIÑO, K.; RUDD, P. M. et al. Methodologies for screening of bacteria-carbohydrate interactions: anti-adhesive milk oligosaccharides as a case study. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, p. 53-59, 2012.

LAPARRA, J. M. et al. Maillard-type glycoconjugates from dairy proteins inhibit adhesion of *Escherichia coli* to mucin. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1435-1443, 2011.

LARSEN, P. B. Chapter 10 - Consequences of termination of AGP use for pig health and usage of antimicrobials for therapy and prophylaxis. In: SØRENSEN, J. T.; JENSEN, B. B. (Ed.). **Beyond Antimicrobial Growth Promoters in Food Animal Production**. Denmark: Danish Institute of Agricultural Sciences, 2002. p. 67-72.

LASSITER, C. A. Antibiotics as growth stimulants for dairy cattle: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 38, n. 10, p. 1102-1138, 1955.

LAUDERDALE, T.L. et al. Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 819-823, 2007.

LAUX, D. C. et al. Identification and characterization of mouse small intestine mucosal receptors for *Escherichia coli* K-12 (K88ab). **Infection and Immunity**, v. 52, n. 1, p. 18-25, 1986.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEDESMA-OSUNA, A. I.; RAMOS-CLAMONT, G.; VAZQUEZ-MORENO, L. Biorecognition of chemically modified bovine serum albumin with lactose prepared under different conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9734-9739, 2009.

LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.

LEEB, M. Antibiotics: A shot in the arm. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 892-893, 2004.

LENGSFELD, C.; FALLER, G.; HENSEL, A. Okra polysaccharides inhibit adhesion of *Campylobacter jejuni* to mucosa isolated from poultry in vitro but not *in vivo*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, n. 1-2, p. 113-125, 2007.

LEUSCH, H. et al. Binding of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 6, p. 2051-2057, 1991.

LEVY, S. Reduced antibiotic use in livestock: how Denmark tackled resistance. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, p. A160-A165, 2014.

LEVY, S. B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 4, p. 695-703, 1992.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. Suppl 12, p. S122-S129, 2004.

LIN, J. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 33, 2014.

LINDAHL, M. Binding of F41 and K99 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* to glycoproteins from bovine and porcine colostrum. **Microbiology and Immunology**, v. 33, n. 5, p. 373-379, 1989.

LINDAHL, M.; CARLSTEDT, I. Binding of K99 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* to pig small intestinal mucin glycopeptides. **Journal of General Microbiology**, v. 136, n. 8, p. 1609-1614, 1990.

LINDAHL, M.; WADSTROM, T. K99 surface haemagglutinin of enterotoxigenic *E. coli* recognize terminal N-acetylgalactosamine and sialic acid residues of glycophorin and other complex glycoconjugates. **Veterinary Microbiology**, v. 9, p. 249-257, 1984.

LINDBERG, A.; SVENSSON, S. **Compositions for therapeutic or diagnostic use containing oligosaccharides**. EP0089940, Sep. 28, 1983.

LINDHORST, T. K.; KIEBURG, C.; KRALLMANN-WENZEL, U. Inhibition of the type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli* to erythrocytes by multiantennary alpha-mannosyl clusters: the effect of multivalency. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, n. 6, p. 605-613, 1998.

LINDQUIST, B. L. et al. Adherence of *Salmonella typhimurium* to small-intestinal enterocytes of the rat. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 12, p. 3044-3050, 1987.

LINE, J. E. et al. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. **Poultry Science**, v. 77, n. 3, p. 405-410, 1998.

LIU, D.; GUO, S.; GUO, Y. Xylanase supplementation to a wheat-based diet alleviated the intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged by *Clostridium perfringens*. **Avian Pathology**, v. 41, n. 3, p. 291-298, 2012.

LIU, P. et al. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 2609-2618, 2008.

_____. Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K88. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 3871-3879, 2010.

MAF. **Antibiotic Sales and Use Overview 2004 - 2009**. Wellington: Ministry of Agriculture and Forestry, 2010.

MAHDAVI, J. et al. A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. **Open Biology**, v. 4, n. 1, 2014.

MAIORANO, R. et al. Evaluation of plant materials for alternative adhesion of *E. coli* K88 (ETEC) in weaning pigs. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 147, 2007.

MALDONADO-GOMEZ, M. X. et al. Adherence inhibition of enteric pathogens to epithelial cells by bovine colostrum fractions. **International Dairy Journal**, v. 40, p. 24-32, 2015.

- MANTHEY, C. F. et al. Human milk oligosaccharides protect against enteropathogenic *Escherichia coli* attachment *in vitro* and EPEC colonization in suckling mice. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 165-168, 2014.
- MANTLE, M. et al. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 11, p. 3292-3299, 1989.
- MANTLE, M.; HUSAR, S. D. Adhesion of *Yersinia enterocolitica* to purified rabbit and human intestinal mucin. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 6, p. 2340-2346, 1993.
- _____. Binding of *Yersinia enterocolitica* to purified, native small intestinal mucins from rabbits and humans involves interactions with the mucin carbohydrate moiety. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1219-1227, 1994.
- MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011.
- MARTIN, M. J.; MARTIN-SOSA, S.; HUESO, P. Binding of milk oligosaccharides by several enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from calves. **Glycoconjugate Journal**, United States, v. 19, n. 1, p. 5-11, 2002.
- MARTIN-SOSA, S.; MARTIN, M. J.; HUESO, P. The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 10, p. 3067-3072, 2002.
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.
- MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F.; ANDERSSON, D. I. Predicting antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 958-965, 2007.
- MATHER, A. E. et al. Distinguishable Epidemics of Multidrug-Resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in Different Hosts. **Science**, v. 341, n. 6153, p. 1514-1517, 2013.
- MATHEW, A. G.; CISELL, R.; LIAMTHONG, S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 115-133, 2007.
- MAZEL, D.; DAVIES, J. Antibiotic resistance in microbes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, n. 9-10, p. 742-754, 1999.
- MCDERMOTT, P. F.; WHITE, D. G. Antibiotic mechanisms of action. In: MAHON, C. R.; LEHMAN, D. C.; MANUSELIS, G. (Ed.). **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 4 ed. Maryland Heights: Saunders Elsevier, 2011. cap. 12, p. 261-275.
- MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, Suppl. 3, p. S93-S106, 2002.

MCHAN, F. et al. In vitro attachment of *Salmonella typhimurium* to chick ceca exposed to selected carbohydrates. **Avian Diseases**, v. 33, n. 2, p. 340-344, 1989.

MCSWEEGAN, E.; WALKER, R. I. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 141-148, 1986.

MCWILLIAMS, B. D.; TORRES, A. G. EHEC Adhesins. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 2, p. EHEC-0003-2013, 2014.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916-932, 2013.

MELLON, M.; BENBROOK, C.; BENBROOK, K. L. **Hogging it! Estimates of antimicrobial abuse in livestock**. Cambridge: Union of Concerned Scientists, 2001.

MENCONI, A. et al. Immuno-modulation and anti-inflammatory effects of antibiotic growth promoters versus probiotics in the intestinal tract. **Journal of Microbiology Research and Reviews**, v. 2, n. 7, p. 62-67, 2014.

METCALFE, J. W. et al. Characterization and identification of a porcine small intestine mucus receptor for the K88ab fimbrial adhesin. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 91-96, 1991.

MIRELMAN, D.; ALTMANN, G.; ESHDAT, Y. Screening of bacterial isolates for mannose-specific lectin activity by agglutination of yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 328-331, 1980.

MITSUHASHI, S. Drug resistance in bacteria: history, genetics and biochemistry. **J Journal of International Medical Research**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 1993.

MO, H.; ZHU, Y.; NOUT, M. J. *In vitro* digestion enhances anti-adhesion effect of tempe and tofu against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 166-168, 2012.

MODI, C. M. et al. Growth promoting use of antimicrobial agents in animal. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 8, p. 4, 2011.

MOLIST, F. et al. Effect of wheat bran on the health and performance of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K88+. **Livestock Science**, v. 133, n. 1-3, p. 214-217, 2010.

_____. 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.

MOORE, P. R. et al. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. **Journal of Biological Chemistry**, v. 165, n. 2, p. 437-441, 1946.

MORAN, C. A. Nutritional approaches to controlling *Salmonella*. **Pig Progress**, v. 25, n. 2, 2009.

MORRIS, J.; STEVENS, A.; SOJKA, W. Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from *Escherichia coli* B41. **Journal of general microbiology**, v. 99, n. 2, p. 353-357, 1977.

MORROW, A. L.; NEWBURG, D. S.; RUIZ-PALACIOS, G. M. **Milk oligosaccharide compositions and use thereof in treating infection in animals**. WO2010120682, Oct. 21, 2010.

_____. **Oligosaccharide compositions and use thereof in the treatment of infection**. US7893041, Feb. 22, 2011a.

_____. **Oligosaccharide compositions and use thereof in the treatment of infection**. US20110207659, Ago. 25, 2011b.

MOURICOUT, M. Swine and cattle enterotoxigenic *Escherichia coli*-mediated diarrhea. Development of therapies based on inhibition of bacteria-host interactions. **European Journal of Epidemiology**, v. 7, n. 6, p. 588-604, 1991.

MOURICOUT, M. et al. Characterization of glycoprotein glycan receptors for *Escherichia coli* F17 fimbrial lectin. **Microbial Pathogenesis**, v.18, p. 297-306, 1995.

_____. Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbriae: treatment of experimental colibacillosis. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 1, p. 98-106, 1990.

MOURICOUT, M. A.; JULIEN, R. A. Pilus-mediated binding of bovine enterotoxigenic *Escherichia coli* to calf small intestinal mucins. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 5, p. 1216-1223, 1987.

MOURÃO, J. L. et al. Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 1-2, p. 107-120, 2006.

MUNIR, M. et al. **Utilização de hidratos de carbono para eliminar infecções intestinais em animais**. PT1357917, Nov. 5, 2001.

MØLBAK, K. et al. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 19, p. 1420-1425, 1999.

NAESS, V.; JOHANNESSEN, C.; HOFSTAD, T. Adherence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to porcine intestinal brush border membranes. **APMIS**, v. 96, n. 8, p. 681-687, 1988.

NAIDU, S. Specific binding of lactoferrin to *Escherichia coli* isolated from human intestinal infections. **APMIS**, v. 99, n. 7-12, p. 1142-1150, 1991.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NAUGHTON, P. J.; MIKKELSEN, L. L.; JENSEN, B. B. effects of nondigestible oligosaccharides on *Salmonella enterica* 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.

NEESER, J. R.; WURSCH, P. **Glycopeptide and oligosaccharide antibacterial compositions**. US4939123, Jul. 3, 1990.

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. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 2, p. 428-436, 1986.

NEWBURG, D. S. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 117-127, 1999.

NEWBURG, D. S. et al. Inhibition of *Salmonella typhimurium* by human milk sulfatides. **Pediatric Research**, v. 45, n. 4, p. 116A, 1999.

NEWELL, D. G. et al. Foodborne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. Suppl 1, p. S3-S15, 2010.

NIEWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, v. 86, n. 4, p. 605-609, 2007.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 382-388, 1994.

_____. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 20, p. 5853-5859, 1996.

NORRBY, S. R.; NORD, C. E.; FINCH, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 115-119, 2005.

NOSEDA, M. D. et al. **Extrato de microalgas marinhas com capacidade de aderência à bactérias patogênicas**. BR1020130107980, May 5, 2013.

_____. **Extrato de farelo de soja como inibidor bacteriano e processo para produção do mesmo**. BR1020120309106, Dez. 4, 2012.

NVAL/MAFF. **A Report on the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System -2000 to 2007**. Tokyo: National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2009.

O'BRIEN, T. F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. Suppl 3, p. S78-S84, 2002.

O'MAHONY, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 3-4, p. 285-296, 2005.

OFEK, I.; BEACHEY, E. H. Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 22, n. 1, p. 247-254, 1978.

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, n. 5595, p. 623-625, 1977.

OFEK, I.; SHARON, N.; ABRAHAM, S. N. Bacterial Adhesion. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3 ed. Singapore: Springer, 2006. v. 2, cap. 1.2, p. 16-31.

OKEKE, I. N.; EDELMAN, R. Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. **Clinical Infectious Diseases**, United States, v. 33, n. 3, p. 364-369, 2001.

OLD, D. C. Inhibition of the interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by D-Mannose and other carbohydrates. **Journal of General Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 149-157, 1972.

OLDFIELD, E.; FENG, X. Resistance-resistant antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 12, p. 664-674, 2014.

OLIVEIRA, I. R. D. et al. Binding of lactoferrin and free secretory component to enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, p. 29-33, 2001.

_____. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesion to Caco-2 cells by human milk and its immunoglobulin and non-immunoglobulin fractions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 86-92, 2007.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E.; JAYARAO, B. M. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 3, p. 337-355, 2011.

ONO, E. et al. Ganglioside epitope recognized by K99 fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 3, p. 907-911, 1989.

OYOFU, B. A. et al. Effect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 33, n. 3, p. 531-534, 1989a.

_____. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-Mannose. **Poultry Science**, v. 68, n. 10, p. 1357-1360, 1989b.

_____. Inhibition by Mannose of *in vitro* colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v. 68, n. 10, p. 1351-1356, 1989.

PAERREGAARD, A. et al. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 253-260, 1991.

PAGE, S. W. Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: the benefits. In: BARUG, D. et al (Ed.). **Antimicrobial Growth Promoters**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 19-51.

PAHO. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3rd. Washington: Pan American Health Organization, 2001.

PALMEIRA, P. et al. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence to HEp-2 cells by bovine colostrum and milk. **Allergologia Et Immunopathologia**, v. 29, n. 6, p. 229-237, 2001.

PANTOSTI, A. et al. Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban. **Lancet**, v. 354, n. 9180, p. 741-742, 1999.

PARKAR, S. G. et al. Gut health benefits of kiwifruit pectins: Comparison with commercial functional polysaccharides. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 210-218, 2010.

PARKER, P. et al. Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, n. 1, p. 89-97, 2010.

PAYNE, D.; O'REILLY, M.; WILLIAMSON, D. The K88 fimbrial adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* binds to beta 1-linked galactosyl residues in glycosphingolipids. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3673-3677, 1993.

PENDERS, J. et al. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 87, 2013.

PERRETEN, V. et al. Antibiotic resistance spread in food. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 801-802, 1997.

PERSELL, S. D. et al. Use of behavioral economics and social psychology to improve treatment of acute respiratory infections (BEARI): rationale and design of a cluster randomized controlled trial - study protocol and baseline practice and provider characteristics. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 290, 2013.

PETERSON, R. et al. Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. **Glycobiology**, v.23, p. 1425-1438, 2013.

PETTIGREW, J. E. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 1. **Animal Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 207-215, 2006.

PHILLIPS, I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 28-52, 2004.

PIRNAY, J. P. et al. The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure? **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 4, p. 934-937, 2011.

POOLE, T. L. et al. Antimicrobial Resistance and the Microflora of the Gastrointestinal Tract. In: BEIER, R. C.; PILLAI, S. D.; PHILLIPS, T.D. (Ed.). **Preharvest and Postharvest Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions**. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. cap. 17, p. 213-226.

PRIETO, P. A.; RUIZ-PALACIOS, G. M. **Compositions containing an alpha-1,2-fucose linkage and uses thereof**. WO1999056754, Nov. 11, 1999.

QUINTERO-VILLEGAS, M. I. et al. Adherence inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2748-2754, 2013.

RAMOS-CLAMONT, G. et al. *Escherichia coli* K88 interaction with IgA oligosaccharides. **EXCLI Journal**, v. 6, p. 10-22, 2007.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117-128, 2010.

REDONDO, L. M. et al. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 118, 2014.

RETI, K. L. et al. Effect of antimicrobial growth promoter administration on the intestinal microbiota of beef cattle. **Gut Pathogens**, v. 5, p. 8, 2013.

RHOADES, J. et al. Inhibition of the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* strains to HT-29 cells in culture by chito-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 57-59, 2006.

_____. Oligosaccharide-mediated inhibition of the adhesion of pathogenic *Escherichia coli* strains to human gut epithelial cells *in vitro*. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 11, p. 2272-2277, 2008.

RIVIER, D. A.; DAREKAR, M. R. Inhibitors of the adhesiveness of enteropathogenic *E. coli*. **Experientia**, v. 31, n. 6, p. 662-664, 1975

ROBERTS, C. L. et al. Soluble plantain fibre blocks adhesion and M-cell translocation of intestinal pathogens. **Journal of Nutrition Biochem**, v. 24, n. 1, p. 97-103, 2013.

ROBERTS, R. R. et al. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 8, p. 1175-1184, 2009.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A. et al. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 293-297, 2013.

ROE, M. T.; PILLAI, S. D. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 622-626, 2003.

ROUBOS-VAN DEN HIL, P. J. et al. Bioactivity of tempe by inhibiting adhesion of ETEC to intestinal cells, as influenced by fermentation substrates and starter pure cultures. **Food Microbiology**. v. 27, p. 638-644, 2010.

ROUBOS-VAN DEN HIL, P. J.; NOUT, M. J. R. Anti-Diarrhoeal Aspects of Fermented Soya Beans. In: EL-SHEMY, H. (Ed.). **Soybean and Health**. InTech, 2011. cap. 17, p. 383-406.

ROUBOS-VAN DEN HIL, P. et al. Fermented soya bean (tempe) extracts reduce adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to intestinal epithelial cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 1013-1021, 2009.

RUMA. **Ruma® position paper on antibiotic resistance and antibiotic use in livestock**. 2014. Disponível em: <
<http://www.ruma.org.uk/news/RUMA%20POSITION%20PAPER%20ON%20ANTIBIOTIC%20RESISTANCE%20AND%20ANTIBIO.pdf> >.
 Acesso em: 15/02/2015.

RUSOFF, L. L.; DAVIS, A. V.; ALFORD, J. A. Growth-Promoting Effect of Aureomycin on Young Calves Weaned from Milk at an Early Age: One Figure. **The Journal of Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 289-300, 1951.

RUSSELL, R. G.; BLAKE, D. C. Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 9, p. 3773-3779, 1994.

SAJJAN, S. U.; FORSTNER, J. F. Characteristics of binding of *Escherichia coli* serotype O157:H7 strain CL-49 to purified intestinal mucin. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 860-867, 1990a.

_____. Role of the putative "link" glycopeptide of intestinal mucin in binding of pilated *Escherichia coli* serotype O157:H7 strain CL-49. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 868-873, 1990b.

SAKANAKA, S. et al. **Composition for Prophylaxis of Intestinal Tract Infectious Disease**. JP2002121138, Apr. 23, 2002.

SAKARYA, S. et al. Sialic acid is required for nonspecific adherence of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhi on Caco-2 cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 58, p. 330-335, 2010.

SALISBURY, J. G. et al. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, n. 3, p. 153-164, 2002.

SALIT, I. E.; GOTSCHLICH, E. C. Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 5, p. 1169-1181, 1977.

SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**, England, v. 12, n. 9, p. 412-416, 2004.

SANCHEZ, J.; JONSON, G. Binding of bacteria to carbohydrates immobilized on beads to demonstrate the presence of cell-associated hemagglutinins in *Vibrio cholerae*. **APMIS**, v. 98, n. 1-6, p. 353-357, 1990.

SANCHEZ, R. et al. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* cells expressing F17 fimbriae to small intestinal mucus and brush-border membranes of young calves. **Microbial Pathogenesis**, v. 15, n. 6, p. 407-419, 1993.

SANTOS, F. S. D. L. et al. The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market-aged broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, n. 1, p. 61-64, 2009.

SARABIA-SAINZ, A. I. et al. Biorecognition of *Escherichia coli* K88 adhesin for glycosylated porcine albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 175-181, 2009.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SCHENGRUND, C.L.; THOMPSON, J. **Compounds and methods for treating and preventing bacterial and viral disease**. WO9826662, Dec. 17, 1998.

SCHMID, A. et al. Prevalence of extended-spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* on bavarian dairy and beef cattle farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 3027-3032, 2013.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 6, p. 431-437, 2001.

SCIENCE AND TECHNOLOGY COMMITTEE. **Ministers must stop unnecessary use of antibiotics in healthcare and farming**. London, 2014. Disponível em: <
<http://www.parliament.uk/business/committees/committees-a-z/commons->

select/science-and-technology-committee/news/report-amr/ >. Acesso em: 15/02/2015.

SCIENCE AND TECHNOLOGY COMMITTEE. **Resistance to antibiotics and other antimicrobial agents**. London: Science And Technology Committee Reports In The Current Parliament, 1998.

SEAL, B. S. et al. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. **Animal Health Research Reviews**, v. 14, n. 1, p. 78-87, 2013.

SEARLE, L. E. et al. A mixture containing galactooligosaccharide, produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 37-48, 2009.

_____. Purified galactooligosaccharide, derived from a mixture produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adhesion and invasion *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 1428-1439, 2010.

SEGUIN, J. C. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1459-1463, 1999.

SEIGNOLE, D. et al. Characterization of O-glycan moieties of the 210 and 240 kDa pig intestinal receptors for *Escherichia coli* K88ac fimbriae. **Microbiology**, v. 140, p. 2467-2473, 1994.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 90-101, 2015.

SHEFFY, B. E. et al. Comparison of growth responses of 2-day-old pigs to streptomycin, aureomycin, and crude apf, alone and in combination with B121. **Journal of Animal Science**, v. 11, n. 1, p. 97-102, 1952.

SHINICHI, H.; TAKASHI, K.; MITSURO, I. **Mannose-based polysaccharide-containing feed**. JP8173055, Jul. 9, 1996.

SHOAF, K. et al. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 12, p. 6920-6928, 2006.

SILVA, M. L.; GIAMPAGLIA, C. M. Colostrum and human milk inhibit localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Acta Paediatrica**, v. 81, n. 3, p. 266-267, 1992.

SINGER, R. S. et al. Antibiotic resistance-the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 47-51, 2003.

SLINGER, S. J. et al. The influence of animal protein factor supplements and antibiotics on the incidence and severity of white feathers in turkeys. **Journal of Nutrition**, v. 43, n. 3, p. 345-355, 1951.

SMIT, H. et al. Isolation and structural characterization of the equine erythrocyte receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbrial adhesin. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 578-584, 1984.

SMITH, C. J.; KAPER, J. B.; MACK, D. R. Intestinal mucin inhibits adhesion of human enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 269-276, 1995.

SMITH, D. L. et al. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6434-6439, 2002.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important foodborne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SPRING, P. et al. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, n. 2, p. 205-211, 2000.

STANTON, T. B. A call for antibiotic alternatives research. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 111-113, 2013.

STARR, M. P.; REYNOLDS, D. M. Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 41, n. 11, p. 1375-1380, 1951.

STOKSTAD, E. L. R. et al. The multiple nature of the animal protein factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, n. 2, p. 647-654, 1949.

STORK, W. The Top Pharmaceuticals that Changed the World: Prontosil. **Chemical & Engineering News**, v. 83, n. 25, 2005.

STRUWE, W. B. et al. Identification of O-glycan structures from chicken intestinal mucins provides insight into *Campylobacter jejuni* pathogenicity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 6, p. 1464-1477, 2015.

STUTZENBERGER, F. J. et al. **Adhesin-specific nanoparticles and process for using same**. US7682631, Oct. 1, 2010.

SUGITA-KONISHI, Y. et al. Preventive effect of sialylglycopeptide-nondigestive polysaccharide conjugates on *Salmonella* infection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5443-5448, 2004.

_____. Inhibition of bacterial adhesion and salmonella infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3607-3613, 2002.

SUNDU, B.; KUMAR, A.; DINGLE, J. Palm kernel meal in broiler diets: effect on chicken performance and health. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 2, p. 316-325, 2006.

TALBOT, G. H. et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of america. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 5, p. 657-668, 2006.

TENEBERG, S. et al. Receptor-active glycolipids of epithelial cells of the small intestine of young and adult pigs in relation to susceptibility to infection with *Escherichia coli* K99. **FEBS Letters**, v. 263, p. 10-14, 1990.

_____. Characterization of gangliosides of epithelial cells of calf small intestine, with special reference to receptor-active sequences for Enteropathogenic *Escherichia coli* K99. **Journal of Biochemistry**, v. 116, n. 3, p. 560-571, 1994.

TERAGUCHI, S. et al. Glycans of bovine lactoferrin function as receptors for the type 1 fimbrial lectin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 1075-1077, 1996.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 493-499, 2001.

THACKER, P. A. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 35-35, 2013.

THE LANCET INFECTIOUS DISEASES. Antibiotic resistance: long-term solutions require action now. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 995, 2013.

THOMAS, R. J. Receptor mimicry as novel therapeutic treatment for biothreat agents. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 1, p. 17-30, 2010.

THORNS, C. Bacterial foodborne zoonoses. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 19, n. 1, p. 226-239, 2000.

TILLOTSON, G. S. Light at the end of the tunnel of antibiotic development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1008-1009, 2013.

TOMAYKO, J. F. et al. The challenge of antimicrobial resistance: new regulatory tools to support product development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 166-168, 2014.

TORNØE, N. Chapter 11 - Consequences of termination of AGP use for broiler health and usage of antimicrobials for therapy and prophylaxis. In: SØRENSEN, J. T., JENSEN, B. B. (Ed.). **Beyond Antimicrobial Growth Promoters in Food Animal Production**. Denmark: Danish Institute of Agricultural Sciences, 2002.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 2005.

TSUTOMU, O.; YUKIKO, N.; SHIGEMITSU, A. **Suppressant for proliferation of gram-negative bacterium**. JP8099884, Apr. 16, 1996.

TZORTZIS, G. et al. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1726-1731, 2005.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; BRUINSMA, N.; STOBBERINGH, E. E. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 146-148, 2000.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 327-335, 2000.

VAN VLIET, A.; KETLEY, J. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. S6, p. 45S-56S, 2001.

VANMAELE, R. P.; ARMSTRONG, G. D. **Treatment of Diarrhea Caused by Enteropathogenic *Escherichia coli***. WO2000051644, Sep. 8, 2000.

VANMAELE, R. P.; HEERZE, L. D.; ARMSTRONG, G. D. Role of Lactosyl Glycan Sequences in Inhibiting Enteropathogenic *Escherichia coli* Attachment. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3302-3307, 1999.

VERNET, G. et al. Surveillance for antimicrobial drug resistance in under-resourced countries. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 20, n. 3, p. 434, 2014.

VICENTE, M. et al. The fallacies of hope: will we discover new antibiotics to combat pathogenic bacteria in time? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 6, p. 841-852, 2006.

VIEIRA, V. V.; DE MORAIS, R. M. S. C. **Composições constituídas por polissacarídeos com atividade anti-viral e anti-adesão bacteriana, respectivas formulações, processo de elaboração das mesmas e suas utilizações**. PT103983, Ago. 31, 2008.

VIMAL, D. B. et al. Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella typhimurium*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 204, n. 1-2, p. 107-117, 2000.

VIOLA, C.; DEVINCENT, S. J. Overview of issues pertaining to the manufacture, distribution, and use of antimicrobials in animals and other information relevant to animal antimicrobial use data collection in the United States. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, n. 2-3, p. 111-131, 2006.

WAGNER, C.; HENSEL, M. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 715, p. 17-34, 2011.

WANG, Y.; GÄNZLE, M. G.; SCHWAB, C. exopolysaccharide synthesized by *Lactobacillus reuteri* decreases the ability of enterotoxigenic *Escherichia coli* to bind to porcine erythrocytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4863-4866, 2010.

WANG, Z. et al. Identification and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius* for development of novel alternatives to antibiotic growth promoters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8795-8802, 2012.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9-11, 2003.

WEGENER, H. C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 439-445, 2003.

_____. Antibiotic resistance—linking human and animal health. In: INSTITUTE OF MEDICINE. **Improving food safety through a One Health approach**. Washington: National Academies Press, 2012. cap. A15, p. 331-348.

WERTHEIM, H. F. L. et al. Providing Impetus, Tools, and Guidance to Strengthen National Capacity for Antimicrobial Stewardship in Viet Nam. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 5, p. e1001429, 2013.

WHO. **Fact sheet n° 268U - Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans**. Geneva: World Health Organization. 2002. p. 1-4.

_____. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: World Health Organization: 2014.

_____. **Draft global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva, 2015. Disponível em: < http://www.who.int/drugresistance/global_action_plan/Objective_4_related_activities_amr_dec_2014.pdf >.

WIERUP, M. The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, n. 2, p. 183-190, 2001.

- WILLEMSEN, P. T.; DE GRAAF, F. K. Multivalent binding of K99 fimbriae to the N-glycolyl-GM3 ganglioside receptor. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4518-4522, 1993.
- WILLER, E. D. M.; LIMA, R. D. L.; GIUGLIANO, L. G. *In vitro* adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. **BMC Microbiology**, v. 4, p. 18, 2004.
- WILSON, J. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216-224, 2002.
- WINDISCH, W. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. Suppl 14, p. E140-E148, 2008.
- WISE, R. Antimicrobial resistance: priorities for action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 585-586, 2002.
- WITTE, W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. Suppl 1, p. S19-S24, 2000.
- _____. Antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 285-286, 2013.
- WITTSCHIER, N. et al. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 6, p. 777-786, 2007.
- WOLD, A. E. et al. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, p. 3073-3077, 1990.
- WOOLHOUSE, M.; FARRAR, J. Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 555-557, 2014.
- WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.
- _____. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175-186, 2007.
- YAN, L.; MENG, Q. W.; KIM, I. H. Effect of an herb extract mixture on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and fecal microbial shedding in weanling pigs. **Livestock Science**, v. 145, n. 1-3, p. 189-195, 2012.
- YANG, B. et al. Glycopeptide derived from soybean β -conglycinin inhibits the adhesion of *Escherichia coli* and *Salmonella* to human intestinal cells. **Food Research International**, v. 41, n. 6, p. 594-599, 2008.
- YANG, Y. et al. Effects of dietary mannanoligosaccharide on growth performance, nutrient digestibility and gut development of broilers given different cereal-based diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 650-659, 2008.

YANMAELE, R. P.; ARMSTRONG, G. D. **Treatment of diarrhea caused by enteropathogenic *Escherichia coli***. US6291435, Sep. 18, 2001.

YUSRIZAL, Y. et al. Feeding native laying hens diets containing palm kernel meal with or without enzyme supplementations. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 2, p. 269-278, 2013.

ZHANG, L. et al. Effects of xylanase supplementation on growth performance, nutrient digestibility and non-starch polysaccharide degradation in different sections of the gastrointestinal tract of broilers fed wheat-based diets. **Asian-Australas Journal of Animal Science**, v. 27, n. 6, p. 855-861, 2014.

ZHANG, W.; SACK, D. A. Progress and hurdles in the development of vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 6, p. 677-694, 2012.

ZHANG, W. et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 1-3, p. 145-152, 2007.

ZHAO, S. et al. Characterization of *Salmonella typhimurium* of animal origin obtained from the national antimicrobial resistance monitoring system. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 2, p. 169-181, 2005.

ZHU, L. et al. Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 689-698, 2010.

APPENDIX 1

TABLE 1.1- CARBOHYDRATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS

(continue)

Target	Material	Reference
<i>Campylobacter</i> spp. <i>C. jejuni</i>	L-Fucose	(Cinco et al., 1984)
	L-Rhamnose	(Naess; Johannessen; Hofstad, 1988)
	L-Fucose, D-Mannose	(Mcsweegan; Walker, 1986)
	D-Galactose, D-Mannose, D-Maltose, D-Glucose	(Russell; Blake, 1994)
	Bovine colostrum oligosaccharides	(Lane; Mariño; Naughton, et al., 2012)
	Pectic oligosaccharides from Valencia orange mesocarp	(Ganan et al., 2010)
	Synthesized oligosaccharide containing terminal mannose, <i>N</i> -acetylneuraminic acid, galactose and fucose	(Day et al., 2009)
	Rhamnogalacturonans from fruit of the okra plant (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	(Wittschier et al., 2007)
	Aqueous extracts and polysaccharides from fruit of the okra plant (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	(Lengsfeld; Faller; Hensel, 2007)
	ActiveMOS®	(Baurhoo; Goldflus; Zhao, 2009)
<i>C. coli</i>	L-Rhamnose	(Naess; Johannessen; Hofstad, 1988)
	Bimos®	(Borowsky; Corcao; Cardoso, 2009)
<i>S. enterica</i> <i>S. enterica</i> sv. Enteritidis	D-Mannose, β 1-4 mannobiose	(Agunos et al., 2007)
	Guar gum hydrolysates	(Ishihara et al., 2000)
	Pumpkin, sesame and sunflower extracts	(Becker; Galletti, 2008)
<i>S. enterica</i> sv. Typhimurium	D-Mannose	(Oyofe; Deloach, et al., 1989b)
	D-Mannose, α -Methylmannoside	(Lindquist et al., 1987)
	Mannose, α -Methylmannoside, Arabinose, Galactose	(Oyofe; Droleskey, et al., 1989)
	D-Fructose, D-mannose, α -Methylmannoside	(Old, 1972)
	L-Fucose, <i>N</i> -Acetylgalactosamine, D-Galactose, L-Arabinose, D-Mannose	(Mchan et al., 1989)
	Lactose, D-Mannose	(Oyofe; Deloach, et al., 1989a)
	α -Methylmannoside, D-mannose, D-fructose and soluble yeast mannan	(Korhonen et al., 1980)
	Terminal α (1,2) fucose	(Chessa et al., 2009)
	Bovine colostrum fractions	(Maldonado-Gomez et al., 2015)
	Galactoligosaccharides	(Tzortzis et al., 2005)
Galactoligosaccharides (Bimuno®)	(Searle et al., 2009; Searle et al., 2010)	
β -Galactomannans (Salmosan®) and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	(Badia et al., 2012; Badia et al., 2013)	
Pectin from kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i> 'Hayward')	(Parkar et al., 2010)	

TABLE 1.2- CARBOHYDRATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS

(continuation)

Target	Material	Reference
<i>S. enterica</i> sv. Typhimurium	Polysaccharides from plantain (<i>Musa</i> spp.)	(Roberts et al., 2013)
	Carrot extract, palm kernel extract, soybean tempe, Biomos®	(Becker et al., 2007)
	Biomos®	(Spring et al., 2000)
	Konjac, palm, sesame, thyme, Biomos®, pumpkin, tomate, soya and sunflower extracts	(Becker; Galletti, 2008)
<i>S. enterica</i> sv. Dublin	Biomos®	(Spring et al., 2000)
	Pumpkin, sesame and tomate extracts	(Becker; Galletti, 2008)
<i>S. enterica</i> spp. <i>enterica</i> sv. Tiphy	<i>N</i> -Acetylneuraminic acid	(Sakarya et al., 2010)
<i>Salmonella</i> <i>fyris</i>	Human milk oligosaccharides	(Coppa et al., 2006)
<i>Escherichia coli</i>	D-mannose	(Ofek; Mirelman; Sharon, 1977)
	D-mannose, α -Methylmannoside	(Ofek; Beachey, 1978)
	Biomos®, purified lignin	(Baurhoo et al., 2007)
	ActiveMOS®	(Baurhoo; Goldflus; Zhao, 2009)
	Grobiotic P®	(Biggs; Parsons, 2008)
	Biomos®	(El-Khalek et al., 2012)
	Bovine colostrum oligosaccharides	(Lane; Mariño; Rudd, et al., 2012)
	Chito-oligosaccharides	(Liu et al., 2008)
	Wheat bran	(Hermes et al., 2009)
	Palm kernel meal	(Yusrizal et al., 2013)
	D-galactosamine	(Laux et al., 1986)
	α -Methylmannoside, D-Mannose, D-Fructose, <i>N</i> -Acetylmannosamine, Yeast mannan	(Salit; Gotschlich, 1977)
	<i>Escherichia coli</i> K-36 EIEC EPEC	Commercial fructooligosaccharides, Mannose
Fucose, Glucose, Mannose		(Ashkenazi; Mirelman, 1984)
D-Mannose, α -Methylmannoside		(Rivier; Darekar, 1975)
Chito-oligosaccharides		(Rhoades et al., 2006; Quintero-Villegas et al., 2013)
Galactoligosaccharides		(Tzortzis et al., 2005)
Galactoligosaccharides, lactulose		(Shoaf et al., 2006)
Bovine colostrum fractions		(Maldonado-Gomez et al., 2015)
Human milk oligosaccharides		(Coppa et al., 2006; Manthey et al., 2014)
Pectic oligosaccharides from carrot		(Kastner et al., 2002)

TABLE 1.3- CARBOHYDRATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS

(continuation)

Target	Material	Reference
EPEC	Pectic oligosaccharides from orange peel	(Rhoades et al., 2008)
ETEC	Fucose, glucose, mannose	(Ashkenazi; Mirelman, 1984)
	Exopolysaccharides by <i>Lactobacillus reuteri</i>	(Wang; Gänzle; Schwab, 2010)
	Exopolysaccharides by <i>Bifidobacterium breve</i> A28	(Alp et al., 2010)
	Chito-oligosaccharides	(Liu et al., 2010)
	Human milk oligosaccharides	(Martin; Martin-Sosa; Hueso, 2002; Martin-Sosa; Martin; Hueso, 2002)
	Pectic oligosaccharides from carrot	(Kastner et al., 2002)
	Glucomannan hydrolysates, mannose	(Al-Ghazzewi; Tester, 2014)
	Polysaccharides from plantain (<i>Musa</i> spp.)	(Roberts et al., 2013)
	Pea (<i>Pisum sativum</i>), faba beans (<i>Vicia faba</i>)	(Becker et al., 2012)
	Pea (<i>Pisum sativum</i> var. Attika), pea hulls, faba beans (<i>Vicia faba</i> var. Divine), faba bean hulls	(Der Meulen; Panneman; Jansman, 2010)
	Wheat bran	(Molist et al., 2010; Molist et al., 2011)
	Wheat bran, casein glycomacropeptide, manoligosaccharides, locust bean extract, <i>Aspergillus oryzae</i> fermentation extract	(Hermes et al., 2011)
	Casein glycomacropeptide, locust bean, exopolysaccharide from olive fermentation brines, wheat bran	(Gonzalez-Ortiz et al., 2013; Gonzalez-Ortiz et al., 2014)
	Sesame seeds extract	(Maiorano et al., 2007)
	Biomos®, pumpkin, soybean tempe, sesame, sunflower, tomate, coffee, artchoke	(Becker; Galletti, 2008)
	Tofu, soybean tempe, cooked soybean	(Mo; Zhu; Nout, 2012)
	Extracts of raw, soaked and cooked soya beans and tempe	(Roubos-Van Den Hil et al., 2009)
	Soybean, cowpea, green pea, red beans cooked and fermented with <i>Rhizopus microsporus</i>	(Roubos-Van Den Hil et al., 2010)
VTEC	Pectic oligosaccharides from orange peel	(Rhoades et al., 2008)
<i>Shigella dysenteriae</i>	Fucose, <i>N</i> -acetylneuraminic acid, <i>N</i> -acetylmannosamine	(Guhathakurta; Sasmal; Datta, 1992)
<i>Shigella flexneri</i>	Fucose, <i>N</i> -acetylneuraminic acid, <i>N</i> -acetylmannosamine	(Guhathakurta; Sasmal; Datta, 1992)
	D-Fructose, D-mannose, α -Methylmannoside	(Old, 1972)
	Fucose, glucose, mannose	(Ashkenazi; Mirelman, 1984)
<i>Shigella sonnei</i>	Polysaccharides from plantain (<i>Musa</i> spp.)	(Roberts et al., 2013)
<i>Vibrio cholerae</i>	D-mannose	(Bhattacharjee; Srivastava, 1978)
	L-fucose, D-mannose	(Jones and Freter, 1976)
	D-mannose, D-glucose, D-fructose, <i>N</i> -acetylglucosamine	(Ehara et al., 1991)

TABLE 1.4- CARBOHYDRATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS

(conclusion)

Target	Material	Reference
<i>Vibrio cholerae</i>	Human milk oligosaccharides	(Coppa et al., 2006)
<i>Vibrio cholerae</i> Classic and El tor	D-mannose, L-fucose	(Ehara et al., 1987; Sanchez; Jonson, 1990)
	Mannose, Fructose	(Hanne; Finkelstein, 1982)

APPENDIX 2

TABLE 1.5 - GLYCOCONJUGATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS

(continue)

Target	Category	Material	Reference
<i>C. jejuni</i>	Glycoprotein	Purified chicken mucin	(Alemka et al., 2010; Struwe et al., 2015)
	Glycoprotein	Human and chicken mucus	(Byrne; Clyne; Bourke, 2007)
	Glycoprotein	Yeast mannoprotein	(Ganan et al., 2009)
	Glycoprotein	<i>Sacharomyces boulardii</i>	(Line et al., 1998)
<i>S. enterica sv. Enteritidis</i>	Glycoconjugate	Sialylglycopeptide from egg yolk conjugate with CMC and CMD	(Sugita-Konishi et al., 2004)
	Glycoconjugate	Egg-yolk-derived sialyloligosaccharide (YDS), asialo-YDS, and sialylglycopeptide of YDS	(Sugita-Konishi et al., 2002)
<i>S. enterica Typhimurium</i>	Glycoprotein	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> cell wall	(Ganner et al., 2010)
	Glycopeptide	β -conglinin from soybean	(Yang et al., 2008)
	Glycopeptide	α -Lactoalbumin and Glycomacropeptide of human milk	(Bruck et al., 2006)
	Glycoprotein, monosaccharide	Rat intestinal brush border membrane glycoprotein, D-mannose	(Ghosh et al., 1996)
	Glycoprotein, monosaccharide	Rat mucus, mannose, α -Methylmannoside,	(Vimal et al., 2000)
	Glycoconjugate, monosaccharide	Bovine Muc 1, D-Galactose, L-Fucose, <i>N</i> -acetylneuraminic acid	(Parker et al., 2010)
	Glycolipid	Human milk sulfatides	(Newburg et al., 1999)
	Glycoprotein	Yeast mannoprotein commercials	(Ganner et al., 2013)
	Glycoprotein	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> cell wall	(Ganner et al., 2010)
	Glycoprotein	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	(Mirelman; Altmann; Eshdat, 1980)
<i>Escherichia coli</i>	Glycoprotein	<i>Sacharomyces boulardii</i>	(Line et al., 1998)
	Glyconjugates	Aromatic α -glycosides of mannose	(Leusch et al., 1991)
	Glycoprotein	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> cell wall	(Ganner et al., 2010)
	Glycoprotein	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	(Mirelman; Altmann; Eshdat, 1980)
	Glyconjugates, monosaccharide	Bovine lactoserum, D-mannose, α -Methylmannoside	(Demierre et al., 1975)
	Glycoconjugate, monosaccharide	Bovine Muc 1, L-Fucose, <i>N</i> -acetylgalactosamine, <i>N</i> -acetylglucosamine, <i>N</i> -acetylneuraminic acid	(Parker et al., 2010)
	Glycoconjugate	Glycoconjugates of β -lactoglobulin and sodium caseinate were obtained via Maillard reaction with galactose and lactose	(Laparra et al., 2011)

TABLE 1.6 - GLYCOCONJUGATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS

(continuation)

Target	Category	Material	Reference
<i>Escherichia coli</i>	Glucosconjugate	Nonimmunoglobulin fraction of human milk and colostrum	(Holmgren; Svennerholm; Ahren, 1981)
	Glycoprotein	Bovine lactoferrin	(Teraguchi et al., 1996)
	Glycoprotein	slgA from human colostrum	(Wold et al., 1990)
<i>Escherichia coli</i> K-12	Glycolipid	Galactosylceramide from piglet ileal mucus	(Blomberg et al., 1993)
DAEC	Glycoprotein	Human milk glycoprotein	(Araújo; Giugliano, 2000)
EAEC	Glycoprotein	Human milk glycoprotein	(Araújo; Giugliano, 2000)
	Glycoprotein	slgA from human colostrum	(Fernandes et al., 2001)
EHEC	Glycoprotein	Ovomucin glycopeptide from hen egg ovomucin	(Kobayashi et al., 2004)
	Glycoprotein	Rat mucin	(Sajjan; Forstner, 1990b)
	Glycoprotein, oligosaccharide	Rat mucin and oligomannosyl derivatives	(Sajjan; Forstner, 1990a)
EIEC	Glycoprotein	IgA from human colostrum	(Carbonare et al., 1995)
EPEC	Glycoconjugate	<i>N</i> -Acetyllactosamine-bovine serum albumin glycoconjugates	(Vanmaele;, Heerze; Armstrong, 1999; Hyland et al., 2006)
	Glycoconjugate	<i>N</i> -Acetyllactosamine-gold nanoparticles glycoconjugates	(Hyland. et al., 2006)
	Glycopeptide	β -conglinin from soybean	(Yang et al., 2008)
	Glycopeptide	α -Lactoalbumin and Glycomacropeptide of human milk	(Bruck et al., 2006)
	Glycoprotein	slgA from human colostrum	(Camara et al., 1994)
	Glycoprotein	Bovine milk and colostrum	(Palmeira et al., 2001)
	Glycoprotein	Human colostrum and milk	(Silva; Giampaglia, 1992)
	Glycoprotein	Rabbit mucin	(Smith; Kaper; Mack, 1995)
	Glycolipid, neoglycoprotein	Asialo-GM ₁ and GM ₂ , globoside and lacto- <i>N</i> -neotetraose	(Jagannatha et al., 1991)
ETEC	Glycoconjugate	Nonimmunoglobulin fraction of human milk and colostrum	(Ashkenazi; Mirelman, 1987)
	Glycoconjugate	Immunoglobulin and nonimmunoglobulin fractions of human milk	(Oliveira et al., 2007)
	Glycoconjugate	Sialylglycopeptide from egg yolk conjugate with CMC and CMD	(Sugita-Konishi et al., 2004)
	Glycoconjugate	Egg-yolk-derived sialyloligosaccharide (YDS), asialo-YDS, and sialylglycopeptide of YDS	(Sugita-Konishi et al., 2002)
	Glycoconjugate	Sialoglycoprotein from human erythrocytes, GM ₂ , mucin type 2 and <i>N</i> -acetylneuraminic acid	(Bartus et al., 1985)
	Glycoconjugate	Lactose-bovine serum albumin glycoconjugates	(Ledesma-Osuna; Ramos-Clamont; Vazquez-Moreno, 2009; Sarabia-Sainz et al., 2009)

TABLE 1.2 - GLYCOCONJUGATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS

(continuation)

Target	Category	Material	Reference
ETEC	Glycolipid	NeuGcLacCer from equine erythrocytes	(Ono et al., 1989)
	Glycoconjugate	Egg yolk antibodies	(Jin et al., 1998)
	Glyconjugates	Aromatic α -glycosides of mannose	(Firon et al., 1987)
	Glycoprotein	Yeast mannoprotein commercials	(Ganner et al., 2013)
	Glycopeptide	Casein glycomacropeptide	(Hermes et al., 2013)
	Glycoprotein, monosaccharide	Fetuin, ovomucin, mucin, hen egg white, cow plasma glycoprotein, mannose and glucose	(Sanchez et al., 1993)
	Glycoprotein	Human colostrum and milk	(Delneri et al., 1997)
	Glycoprotein	Lactoferrin and free secretory component of human milk	(Oliveira et al., 2001)
	Glycoprotein	Bovine lactoferrin	(Kawasaki et al., 2000)
	Glycoprotein	Human lactoferrin	(Naidu, 1991)
	Glycoprotein	Glycoproteins from bovine and porcine colostrum	(Lindahl, 1989)
	Glycoprotein	Glycoproteins and fractions from sow colostrum	(Gibbons; Jones; Sellwood, 1975)
	Glycoprotein	Fat globule membrane of sow milk	(Atroshi et al., 1983)
	Glycoprotein	Ovine submaxillary mucin and α 1-acid glycoprotein	(Anderson; Whitehead; Kim, 1980)
	Glycoprotein	IgA oligosaccharides from porcine serum	(Ramos-Clamont et al., 2007)
	Glycoprotein	Mucin-type sialoglycoproteins from porcine intestinal cells	(Grange et al., 1998)
	Glycoprotein	Porcine brush border glycoprotein	(Erickson et al., 1992; Seignole et al., 1994)
	Glycoprotein	Porcine small intestinal mucus	(Lindahl; Carlstedt, 1990; Metcalfe et al., 1991)
	Glycoprotein	Glycophorin from bovine erythrocytes	(Mouricout et al., 1995)
	Glycoprotein	Human glycophorin and bovine submaxillary mucin	(Lindahl; Wadstrom, 1984)
	Glycoprotein	Bovine plasma glycoprotein	(Mouricout; Julien, 1987; Mouricout et al., 1990; Mouricout, 1991)
	Glycolipid	Glycosphingolipids	(Payne; O'reilly; Williamson, 1993)
	Glycolipid	Glycosphingolipids from pigs	(Grange et al., 1999)
Glycolipid	Glycolipids from piglets intestine	(Kyogashima; Ginsburg; Krivan, 1989; Teneberg et al., 1990)	
Glycolipid	Glicolipids and porcine serum transferrin	(Grange et al., 2002)	
Glycoprotein	NeuGcLacCer from equine erythrocytes	(Ono et al., 1989)	
Glycolipid	NeuGc-GM ₃ from equine erythrocytes	(Smit et al., 1984)	
Glycolipid	Ganglioside GM ₂	(Faris; Lindahl; Wadström, 1980)	

TABLE 1.2 - GLYCOCONJUGATES THAT PRESENT POTENTIAL TO INHIBIT THE ADHESION OF ENTEROPATHOGENS

(conclusion)

Target	Category	Material	Reference
ETEC	Glycolipid	Ganglioside GM ₃	(Willemsen; De Graaf, 1993)
	Glycolipid	Gangliosides GM ₃ , GM ₂ and GD _{1a} from calf intestine	(Teneberg et al., 1994)
<i>S. dysenteriae</i>	Glycoprotein	Human milk glycoprotein	(Willer; Lima; Giugliano, 2004)
<i>S. flexneri</i>	Glycoconjugate, monosaccharide	Lipopolysaccharide from <i>Shigella flexneri</i> , fucose and glycopeptide derived from lactotransferrin	(Izhar; Nuchamowitz; Mirelman, 1982)
	Glycopeptide	α -Lactoalbumin and Glycomacropeptide of human milk	(Bruck et al., 2006)
	Glycoprotein	Guinea pig mucus	(Dinari et al., 1986)
	Glycoprotein	Human milk glycoprotein	(Willer; Lima; Giugliano, 2004)
<i>S. sonnei</i>	Glycoprotein	Human milk glycoprotein	(Willer; Lima; Giugliano, 2004)
<i>V. cholerae</i> Classic	Glucosconjugate	Nonimmunoglobulin fraction of human milk and colostrum	(Holmgren; Svennerholm; Ahren, 1981)
<i>V. cholerae</i> Classic and El tor	Glucosconjugate	Human milk	(Holmgren; Svennerholm; Lindblad, 1983)
<i>Y. enterocolitica</i>	Glycoconjugate	Nonimmunoglobulin fraction of human milk	(Jensen; Paerregaard, 1991)
	Glycoprotein	Rabbit mucus	(Paerregaard et al., 1991)
<i>Y. enterocolitica</i>	Glycoprotein	Rabbit and human mucins	(Mantle et al., 1989; Mantle and Husar, 1993)
	Glycoprotein, oligosaccharide	Rabbit and human mucins, mucins oligosaccharides	(Mantle; Husar, 1994)

APPENDIX 3

TABLE 1.7 - PATENTS CLAIMING MOLECULES WITH POTENTIAL PATHOGEN INHIBITION

(continue)

Source Material	Active Components	Targets	ID Patent	Reference
Galactan or carrageenans hydrolysate	Galactoligosaccharides	ETEC	EP0089940	(Lindberg; Svensson, 1983)
Ovalbumin, soya flour and bean flour	Oligomannosides	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> sv. Typhimurium, <i>Shigella flexneri</i>	US4939123	(Neeser; Wursch, 1990)
Soybean meal extract	β -galactan (1 \rightarrow 4)-linked	<i>S. enterica</i> sv. Tiphymurium	BR1020120309106	(Noseda et al., 2012)
Guar beans, copra meal	Mannose-based polysaccharides	<i>Salmonella</i> sp.	JP8173055	(Shinichi; Takashi; Mitsuro, 1996)
Beet pulp, chicory, citrus pulp, rice bran, carob bean, gum talha and coconut endosperm fiber	Fructooligosaccharide, galactooligosaccharide, inulin, lactosucrose, maltooligosaccharide, xylooligosaccharide and/or raffinose	<i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>	WO2001065949	(Baillon; Giffard, 2001)
Guar gum, locust bean gum, tamarind gum, xanthan gum, gum tragacanth, gum Arabic, Cassia gum, pectin, pullulan, algin, carrageenan, locust bean seed, and palm kernel meal	Mannose-based polysaccharides containing or not galactose, rhamnose, ribose, galactosamine, fucose and/or arabinose residues	<i>Salmonella</i> sp.	JP8099884; US6126961; WO2003101219; EP2110024; WO2009144070	(Tutomu;, Yukiko; Shigemitsu, 1996; Kross, 2000; Barberà and Sanz, 2003; Barberà et al., 2009a; Barberà et al., 2009b)
Fucoidan	Fucose residue in α (1 \rightarrow 2)-linkage	<i>E. coli</i> , <i>V. cholerae</i>	WO1999056754; JP2002226496	(Prieto; Ruiz-Palacios, 1999; Ajisaka; Toba, 2002)
Milk	Oligosaccharide or glycoconjugate containing fucose, galactose, mannose, sialic acid or <i>N</i> -acetylglucosamine	<i>Campylobacter</i> , <i>Vibrio</i> and other infectious agents	WO2010120682	(Morrow; Newburg; Ruiz-Palacios, 2010)
Hen's egg yolk, oligosaccharide-bound proteins and oligosaccharide-bound peptides	Sialyloligosaccharides, sialyloligosaccharide proteins and sialyloligosaccharide peptides	<i>S. enteritis</i> , ETEC	JP2002121138	(Sakanaka et al., 2002; Schengrund; Thompson, 1998)

TABLE 1.8 - PATENTS CLAIMING MOLECULES WITH POTENTIAL PATHOGEN INHIBITION

(continuation)

Source Material	Active Components	Targets	ID Patent	Reference
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polysaccharide sulphated containing rhamnose, glucose, fructose, ribose, galactose, xylose, mannose, galacturonic or glucuronic acid	<i>E.coli</i> and other infectious agents	PT103983	(Vieira; De Morais, 2008)
Microalgae Extract (<i>Pavlova girans</i> and <i>Pavlova lutheri</i>)	β -glucans and heteropolysaccharides containing glucose, mannose and xylose	<i>S. enterica</i> sv. Tiphymurium	BR1020130107980	(Noseda et al., 2013)
Chemical synthesis	Oligosaccharide comprising sequences of: <i>N</i> -acetylgalactosamine; difucosyllactose; lacto- <i>N</i> -fucopentaose isomers; GM ₁ , GM ₂ , GM ₃ gangliosides; lactosamine of <i>N</i> -linked glycoproteins; <i>O</i> -linked glycoproteins or glycolipids	ETEC	WO2000051644; US6291435	(Vanmaele; Armstrong, 2000; Yanmaele; Armstrong, 2001)
Chemical synthesis	Oligosaccharide comprising sequences of: β Gal(1-4) β Glc, β Gal(1-3) β GalNAc, β GalNAc(1-4) β Gal, β Gal(1-3) β Gal, β Gal(1-3) β GalNAc(1-4) β Gal, and α NeuAc(2-3) β Gal covalently attached to derivatized silica particles	ETEC	US6069137	(Heerze; Armstrong, 2000)
Chemical synthesis	Biofunctionalized nanoparticles containing D-mannose	<i>E.coli</i> , <i>C.jejuni</i>	US7682631	(Stutzenberger et al., 2010)
Chemical synthesis employing recombinant yeast and bacteria	Oligosaccharide or glycoconjugate containing fucose group α (1 \rightarrow 3,4)-linkage to <i>N</i> -acetylglucosamine or galactose; fucose group α (1,3)-linkage to glucose group; 2'-fucosyllactose or 2'-fucosyl- <i>N</i> -acetyllactosamine	<i>V. cholerea</i> , <i>C. jejuni</i> , EPEC, ETEC, EHEC, <i>Shigella</i> and other infectious agents	US7893041; US20110207659	(Morrow; Newburg; Ruiz-Palacios, 2010; 2011a)
-	1- <i>O</i> - α -D-glucopyranosyl-D-sorbitol, 6- <i>O</i> - α -D-glucopyranosyl-sorbitol, lactobionic acid, maltobionic acid, condensed palatinose, difructose dianhydrides, fructooligosaccharides, hydrated fructooligosaccharides, chitooligosaccharides, chitosan oligosaccharides, galactomannan oligosaccharides and oligogalacturonide	<i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i>	PT1357917; WO2002060452; EP1698341	(Munir et al., 2001; Klingeberg et al., 2003; Klingeberg et al., 2006)

TABLE 1.9 - PATENTS CLAIMING MOLECULES WITH POTENTIAL PATHOGEN INHIBITION

Source Material	Active Components	Targets	ID Patent	Reference
-	Homotrimer, heterotrimer, homotetramer and/or heterotetramer of pentose (such as ribose, arabinose, xylose and lyxose), hexose (such as allose, altrose, gulose, idose, talose and mannose), glucuronic acid, galacturonic acid or their derivatives and mixtures	<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Vibrio</i> and other <i>infectious genres</i>	WO2007138047; US8729051	(conclusion) (Bruggeman; Deschepper, 2007; Bruggeman; Deschepper, 2014)

CAPÍTULO 2

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS QUIMIOTRANSFORMADOS DE FARELO DE SOJA

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é mundialmente o segundo maior produtor de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (MDIC, 2014). No ano de 2016 estima-se que o “Complexo Soja” (grãos, farelo e óleo) injete na economia, somente com exportações, mais de 30 bilhões de reais (ABIOVE, 2015b).

Embora seja um grão com aplicação bastante versátil, seu uso mais conhecido é na produção de óleo refinado. Esse processo de extração do óleo bruto da soja gera altas quantidades de um subproduto conhecido como farelo de soja (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998).

A composição nutricional do farelo de soja inclui alto teor de proteínas e carboidratos, razão que justifica o fato do farelo de soja ser a principal matéria prima utilizada na fabricação de rações para alimentação animal e sua principal utilização industrial. Sua composição nutricional, baixo custo e alta disponibilidade tornam o farelo de soja uma fonte com potencial de utilização para fins biotecnológicos. Assim, diversas pesquisas e processos têm sido desenvolvidos com o intuito de obter produtos refinados, de maior valor agregado (STRÖHER, 2010).

Estudo anterior, realizado no laboratório de Química de Carboidratos da UFPR, indicou que extratos brutos de farelo de soja tratados quimicamente, apresentaram alto potencial de adesão à *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (NOSEDA et al., 2012; RODRIGUES, 2012). Esses extratos eram compostos por β -galactanas-(1 \rightarrow 4)-ligadas e pectinas, com unidades de α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-ligadas e cadeias laterais de α -L-Araf-(1 \rightarrow 5)-ligadas e β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-ligadas. Entretanto, mais estudos ainda são necessários para identificação das moléculas responsáveis pela atividade biológica.

O objetivo deste capítulo foi, portanto, extrair, isolar e purificar os polissacarídeos quimiotransformados de farelo de soja, bem como determinar, por métodos químicos e espectroscópicos, a composição química dos extratos brutos e determinar a estrutura química fina dos polissacarídeos purificados.

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 SOJA

2.2.1.1 A Soja e a Economia

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] tem origem na China, onde é cultivada há mais de cinco mil anos (LIU, 1999; JOHNSON; WHITE; GALLOWAY, 2008). No Brasil, foi introduzida apenas em 1882, como cultura forrageira. Em 1914, no Rio Grande do Sul, começou a ser produzida como cultura de verão nas áreas de cultivo de trigo (EMBRAPA, 2004). Em decorrência do sucesso como cultura entressafra, em meados dos anos 50, intensificaram-se as pesquisas e exportações. Inicialmente a produção estava concentrada na região Sul, sendo expandida para as regiões do Brasil Central entre as décadas de 70 e 80 (EMBRAPA, 2004; OLIVEIRA, 2009). Hoje a soja já está difundida em grande parte do Brasil.

Os principais produtores mundiais de soja são os Estados Unidos, com produção de 106,9 milhões de toneladas na safra 2014/15, seguido pelo Brasil e Argentina, que na mesma safra, produziram 96,2 e 60,8 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2015). Os três países são responsáveis por mais de 80% da produção mundial. No Brasil, os maiores produtores de soja são os estados do Mato Grosso e Paraná, com produções, em 2014/15, de 28 e 17,2 milhões de toneladas, respectivamente (CONAB, 2015).

A soja brasileira é destinada à produção de grãos, farelo e óleo, formando o chamado “Complexo Soja”, responsável por 13,9% do total das exportações (MDIC, 2014). Como resultado das exportações, em 2014 injetou US\$ 31 bilhões na economia brasileira, US\$ 7 bilhões apenas com farelo de soja (MDIC, 2014; ABIOVE, 2015b). Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE) a estimativa para a próxima safra é que o volume total de soja e derivados exportados ultrapasse 69 milhões de toneladas (ABIOVE, 2015a).

2.2.1.2 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 *Glycine max* (L.) Merrill, a espécie comercial amplamente difundida (CARUSO, 1997).

Sua composição química média em base seca do grão de soja é demonstrada na Tabela 2.1. O teor dos compostos é bastante variável, estando diretamente ligado a fatores como cultivar, época do plantio, localização geográfica e estresse ambiental (LIU, 1999).

TABELA 2.1 - COMPOSIÇÃO APROXIMADA DO GRÃO DE SOJA

Parte do Grão	% do grão	Composição Química (% massa seca)			
		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

NOTA: * Minerais, vitaminas, fitatos e isoflavonas.
 FONTE: LIU (1999).

A soja é a cultura de maior teor proteico (40%) e segundo maior teor de lipídeos (20%), superada apenas pelo amendoim, que apresenta um teor de lipídeos em torno de 48% (LIU, 1999). Ao contrário de outras proteínas vegetais, a proteína da soja é considerada uma proteína completa, pois apresenta todos os aminoácidos essenciais (MICHELFELDER, 2009). O óleo de soja contém alta proporção de ácidos graxos insaturados (80-85% do total de lipídeos) das séries ω -3, ω -6 e ω -9, tais como ácido linoleico, linolênico e oleico (DESAI, 2000).

A soja apresenta também alto teor de carboidratos, aproximadamente 35%, sendo 2% deste valor encontrado sob a forma de amido. Sua parede celular é composta de aproximadamente 30% de pectinas, 50% de hemicelulose e 20% de celulose (GUO, 2009). Cerca de apenas 11% do total de carboidratos da soja corresponde a carboidratos solúveis, sendo encontrados traços de monossacarídeos como glucose e arabinose, e quantidades mensuráveis de dissacarídeos como a sacarose (40–68% do total de carboidratos solúveis) e oligossacarídeos, como estaquiose e rafinose (HONIG; RACKIS, 1979; JOHNSON; WHITE; GALLOWAY, 2008; GUO, 2009).

Além disso, estão presentes, em menores quantidades, diversas outras substâncias, conhecidas como fitoquímicos (isoflavonóides, fitoesteróis, saponinas, fitatos, ácidos fenólicos), correlacionadas nos últimos anos com benefícios únicos à saúde (LIU, 1999; MESSINA, 1999).

2.2.1.3 Usos da Soja

A soja é um grão altamente versátil o qual origina produtos e subprodutos utilizados pela agroindústria, indústria química, farmacêutica, cosmética e alimentícia. A soja 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 (EMPRAPA, 2015).

No entanto, seu uso mais conhecido é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Além do óleo, durante esse processo, se obtém a lecitina, um agente emulsificante largamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (WU; WANG, 2003). Mais recentemente, a soja vem sendo também alvo de estudos na busca por alternativas sustentáveis aos combustíveis fósseis, na produção de biocombustíveis (SIQUEIRA et al., 2008; VASUDEVAN; BRIGGS, 2008; LETTI et al., 2012; SOCCOL et al., 2013).

A soja também vem sendo investigada por seus benefícios na prevenção e no tratamento de doenças crônico-degenerativas como câncer, osteoporose, diabetes e doenças cardiovasculares. Estudos sugerem que o consumo regular de derivados de soja reduz a incidência de câncer de próstata (ZHOU et al., 1999). É também utilizada no tratamento de osteoporose (MESSINA, 1999) e redução de sintomas associados à menopausa (TAKU et al., 2012; MESSINA, 2014), já que apresenta uma molécula com estrutura química semelhante ao estradiol (principal hormônio feminino). Seu consumo tem sido associado ainda com redução da glicemia, hipercolesterolemia, estresse oxidativo e fatores de risco para doenças cardiovasculares (HERMANSEN et al., 2001; FUKUDA et al., 2007; SHAHBAZIAN et al., 2007; SONG et al., 2007; CHANG et al., 2008; CLERICI et al., 2011; VILLANUEVA et al., 2011; SEDAGHAT et al., 2015).

Jimenez-Escrig et al. (2008) demonstraram que o *okara*, resíduo obtido durante a extração do leite de soja, apresenta efeitos prebióticos e alta capacidade antioxidante. Adicionalmente, sua fração proteica apresenta qualidades emulsificantes e propriedades anti-hipertensivas e antioxidantes (O'TOOLE, 1999; JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2010).

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. Estudo complementar, realizado por Berhow et al. (2000) identificou, em extratos metanólicos de soja, saponinas com potencial antígenotóxico, sugerindo que os produtos e subprodutos comerciais da soja podem ser importantes fontes de novos quimioprotetores.

2.2.2 FARELO DE SOJA

Pichat (1995) define a palavra resíduo (do latim *residum*) como toda substância que o produtor abandona ou que se encontra forçado a abandonar. Mundialmente nos últimos anos, têm-se despendido grande esforço para o processamento de resíduos, convertendo-os em subprodutos de modo a agregar valor às cadeias produtivas e reduzir possíveis impactos ambientais negativos (VAZ JR, 2010; ROSA et al., 2011).

Essa necessidade crescente de agregação de valores se mostra como uma fonte de possibilidades para o desenvolvimento de rotas de obtenção de novos produtos menos impactantes ao meio ambiente e alternativo aos produtos já atuantes no mercado. A potencialidade de uso desses resíduos e/ou subprodutos é, portanto, evidente, cabendo estabelecer métodos que viabilizem seu aproveitamento. A diversificação de produtos a ser obtida impacta de forma positiva o setor agroindustrial, repercutindo em benefícios para a sociedade (VAZ JR, 2010).

Dos resíduos de produtos industrializados à base de soja consumidos nos países asiáticos poucos são reaproveitados ou transformados (LI et al., 2013). Já nos EUA, praticamente todo o material derivado da soja é processado. Alimentos a base de soja contêm 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 ou química do óleo dos grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998). Seu preço varia em torno de R\$ 1150,00/t, entre indústrias e cooperativas no Brasil (APROSOJA, 2015). A variação do preço é decorrente da disponibilidade e tipo de farelo (porcentagem de proteína). É um

subproduto relativamente barato com grande potencial de uso como suplemento, fonte de nitrogênio, proteína, polissacarídeos ou substrato em processos biotecnológicos.

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 do farelo de soja inclui açúcares simples (monossacarídeos e dissacarídeos), oligossacarídeos e polissacarídeos (celulose, hemiceluloses, pectina e amido) (LIU, 1999). Sua composição química pode apresentar variações devido à diferenças nas condições ambientais, variedades genéticas e condições de processamento (umidade, tempo e temperatura de secagem, tostagem) (STRÖHER, 2010).

O elevado teor em proteínas, e suas características de digestibilidade, fazem do farelo de soja a principal matéria prima na fabricação de rações para alimentação de animais. Quase 70% do conteúdo proteico das rações animais provêm do farelo de soja (CROMWELL, 2012). Embora grande parte deste subproduto 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 proteicos (STRÖHER, 2010).

2.2.3 POLISSACARÍDEOS DE SOJA

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 à 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 e arabinogalactanas. Aspinall, Begbie, et al. (1967) afirmam que 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 (FURUTA; TAKAHASHI; TOBE; KIWATA, et al., 1998; HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998).

Numerosos trabalhos relatam a extração de polissacarídeos de soja, sob diversas condições diferentes. São reportadas extração de polissacarídeos com agentes quelantes (KAWAMURA; NARASAKI, 1961), extrações em pH neutro (FURUTA et al., 1995; NANAÉ; JUNKO; AKIHIRO, 2007), extrações ácidas sob temperatura elevada e/ou pressão (YAMAGUCHI et al., 1994; FURUTA et al., 1996; NOGUCHI; SHIKANUMA, 1996; YAMAGUCHI; OTA; HATANAKA, 1996; FURUTA; TAKAHASHI; TOBE; KIWATA, et al., 1998; FURUTA; TAKAHASHI; TOBE; MOMEN, 1998; HUA et al., 2010; QI, 2010; TU et al., 2010; NAKAMURA et al., 2012; NOSEDA et al., 2012; RODRIGUES, 2012; FASOLIN, 2013; CHIVERO et al., 2014; XIONG et al., 2015), extrações alcalinas sob temperaturas elevadas e/ou pressão (MORITA, 1965; LABAVITCH; FREEMAN; ALBERSHEIM, 1976; NAKAO; MIYASHITA; TODA, 1978; JATOBÁ, 1996; MA, 2006; XIONG et al., 2015), e ainda extrações decorrentes de ação enzimática (LI, 2010; YAO; ZHENYU; HUA, 2011). Em comum, em relação à composição monossacarídica observa-se a presença de arabinose, galactose e ácido galacturônico, indicando possivelmente a presença de pectinas (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998).

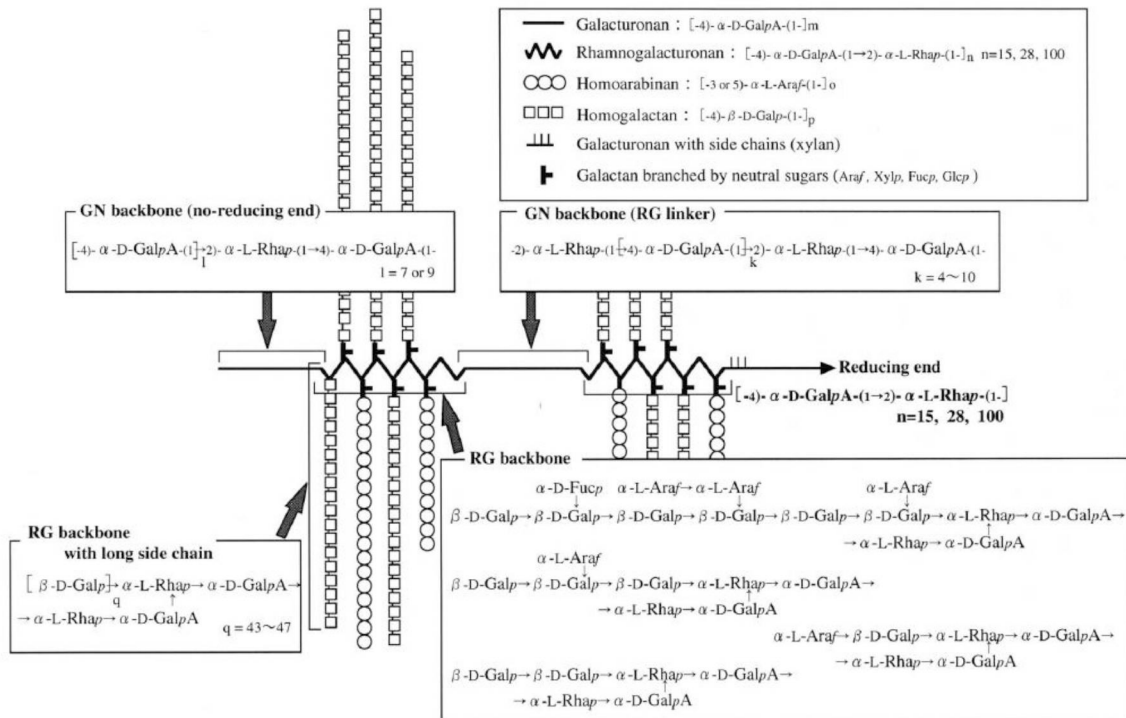
Bainy et al. (2008) encontraram teores de 45% de carboidratos para farelo de soja, sendo a galactose, arabinose e ácidos urônicos os monossacarídeos mais presentes. Glucose foi encontrada em quantidades baixas, o que está em acordo com o trabalho de Huisman, Schols e Voragen (1998). Furuta, Takahashi, Tobe, Kiwata et al. (1998), além de galactose, arabinose e ácidos urônicos encontraram a presença de manose em suas frações, um indicativo de remoção incompleta das cascas da soja, uma vez que estas consistem em grandes extensões de galactomananas (Whistler e Saarnio, 1957).

Dentre os polissacarídeos obtidos da soja, as arabinogalactanas têm sido estudadas intensamente (MORITA, 1965; ASPINALL; BEGBIE, et al., 1967; ASPINALL, COTTRELL, et al., 1967; LABAVITCH; FREEMAN; ALBERSHEIM, 1976). De modo geral, são constituídas por cadeias principais de β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-ligadas, substituídas em O-3 por cadeias laterais de L-Araf (1 \rightarrow 5)-ligadas. No entanto, uma grande variação está presente no grau de ramificação e na distribuição dos substituintes na cadeia (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998).

Cipriani et al. (2009) isolaram a partir de farelo de soja uma arabinogalactana do tipo I (Figura 2.1). Sua cadeia principal é composta de unidades

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→4)-β-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→3) e (1→5)-α-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 β-1,4- e β-1,2-ligada (NAKAMURA et al., 2002a). Estrutura similar foi encontrada por Li et al. (2009), na fração de alto massa molecular (550 kDa), após submeter SSPS à precipitação etanólica.

FIGURA 2.2 - MODELO DE ESTRUTURA QUÍMICA DO SSPS

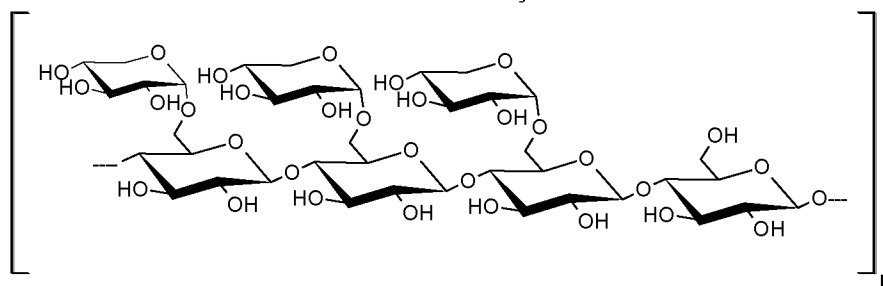


FONTE: NAKAMURA et al. (2002b).

Yamaguchi, Ota e Hatanaka (1996) isolaram de *okara* polissacarídeos pécticos que compreendem regiões de galacturonana e rhamnagalacturonana com cadeias laterais compostas principalmente por arabinanas e galactanas. As regiões de galacturonana são distribuídas nas extremidades redutoras e não redutoras do polímero.

Outros polissacarídeos como arabinanas, arabinogalactanas do tipo II, glucanas, xiloglucanas, xilanas e galactomananas também já foram reportadas para

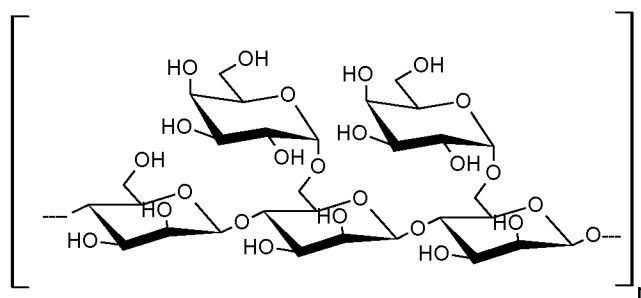
FIGURA 2.4 - XILOGLUCANA OBTIDA POR EXTRAÇÃO ALCALINA DE FARELO DE SOJA



FONTE: HUISMAN et al. (2000).

Hsiao, Anderson e Dale (2006) evidenciaram a presença de β -mananas em farelo de soja. Seu conteúdo variou entre 1,02 – 1,51% m/m nos diferentes farelos analisados. Whistler e Saarnio (1957) isolaram galactomananas da casca da soja. Análises desses polissacarídeos extraídos indicaram uma cadeia principal de (1 \rightarrow 4)-D-Manp substituídas em O-6 por unidades de D-galactopiranosil (Figura 2.5). 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 \rightarrow 4)-ligadas, caracterizada por conter baixa proporção de cadeias laterais. Xilanas com esta estrutura estão associadas com celulose em tecidos lignificados.

FIGURA 2.5 - ESTRUTURA DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DA CASCA DA SOJA



FONTE: WHISTLER, SAARNIO (1957),

2.2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS DE SOJA

Polissacarídeos de diversas origens (plantas; bactérias – proteoglicano de membrana, exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos da parede celular; e fungos – polissacarídeos derivados da parede celular, citoplasma de reserva) podem atuar como modificadores de resposta biológica. A estrutura destes polissacarídeos é bastante diversificada, podendo ser constituídos por diferentes unidades

monossacarídicas, apresentar grupos fosfato, acetil, carboxílicos, sulfatos, peptídeos e lipídeos, e suas ligações glicosídicas podem ser α -, β -, (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) ou (1 \rightarrow 6) (LEUNG et al., 2004).

Koga e Kikuchi (1993) isolaram um complexo polissacarídeo-proteína, a partir de farinha de soja, capaz de modular o sistema imune *in vitro* e *in vivo*. O complexo aumentou a glicólise, a produção de interleucinas 1 pelos macrófagos e a proliferação de esplenócitos. Liao et al. (2001) isolaram polissacarídeos de soja preta, com características de (1 \rightarrow 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 via ativação de células mononucleares, 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 de soja preta promovem mielopoiese em medula óssea suprimida após quimioterapia ou radioterapia.

Chen et al. (2010a) testaram os efeitos de oligossacarídeos de soja sobre níveis de lipídios séricos, glucose e estresse oxidativo em ratos alimentados com dieta rica em gordura. Resultados mostraram uma redução dos níveis de todas as respostas avaliadas nas doses de 150, 300 e 450 mg.kg⁻¹ indicando capacidade para reverter doenças cardio-cerebrovascular. Adicionalmente, Chen et al. (2010b) demonstraram que os oligossacarídeos de soja, compostos por galactose (65,3%), manose (15,6%), frutose (7,8%) e glucose (8,7%) foram também capazes, em doses de 150 e 300 mg.kg⁻¹, de reverter os níveis plasmáticos de ácido láctico, óxido nítrico e fator de crescimento do endotélio vascular, assim como melhorar a atividade de Ca²⁺, Mg²⁺ e Na⁺-K⁺-ATPases. Estes resultados indicam que esses oligossacarídeos podem ter efeitos benéficos na terapia de algumas doenças cardíacas, tais como as doenças das artérias coronárias.

Jimenez-Escrig et al. (2008) e Mateos-Aparicio et al. (2010) identificaram polissacarídeos, derivados de *okara* (polpa resultante da extração do leite de soja), que apresentam potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Essa atividade pode ser atribuída aos polissacarídeos pécticos, embora a contribuição de proteínas residuais não possa ser excluída. Liu, Wen, Zhang, et al. (2015) identificaram que polissacarídeos brutos e purificados, obtidos de soja preta, apresentam alto potencial antioxidante, sendo eficazes na eliminação de ânions superóxidos e

radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Polissacarídeos de soja parcialmente degradados com peróxido de hidrogênio inibiram efetivamente a formação de cristais de oxalato de cálcio, reduzindo o risco de formação de pedras nos rins (YAO et al., 2012). Em adição, esses polissacarídeos degradados enfraqueceram o dano oxidativo de células renais de macacos, resultando em aumento da viabilidade celular.

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 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, além disso, mostraram ainda potencial capacidade hipoglicemiante. Ward e Reichert (1986) e Takahashi et al. (1999) em seus trabalhos demonstraram que polissacarídeos de soja solúveis possuem a capacidade de reduzir o tempo de trânsito gastrointestinal devido à elevada presença de fibras em sua composição.

Shiga et al. (2002) e Mitamura et al. (2003) demonstraram que a ingestão de fibras solúveis de soja impede a osteopenia e hipercolesterolemia induzida por ovariectomia ou gastrectomia em ratos. Adicionalmente, a ingestão das fibras de soja melhoraram a anemia e performance de exercícios em ratos gastrotectomizados (SHIGA et al., 2003).

Cipriani et al. (2009) isolaram a partir de farelo de soja uma arabinogalactana 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 à superfície da mucosa agindo como uma camada protetora; diminuição da atividade secretória de ácido e pepsina e proteção da mucosa pelo aumento da síntese de muco e/ou radicais de limpeza (MATSUMOTO; MORIGUCHI; YAMADA, 1993; YAMADA, 1995; NERGARD et al., 2005).

Neeser, Koellreutter e Wuersch (1986), Neeser e Wursch (1990), Kiers et al. (2002), Kiers et al. (2003), Becker et al. (2007), Becker e Galletti (2008), Rodrigues (2012) e Nosedá et al. (2012) demonstraram em seus trabalhos a capacidade da soja e derivados 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 sugere que as fímbrias do tipo I reconhecem os carboidratos, ligando-se a eles, uma vez que estes estariam mais facilmente disponíveis do que os carboidratos existentes na superfície da mucosa intestinal (OFEK; HASTY; SHARON, 2003).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 MATERIAL

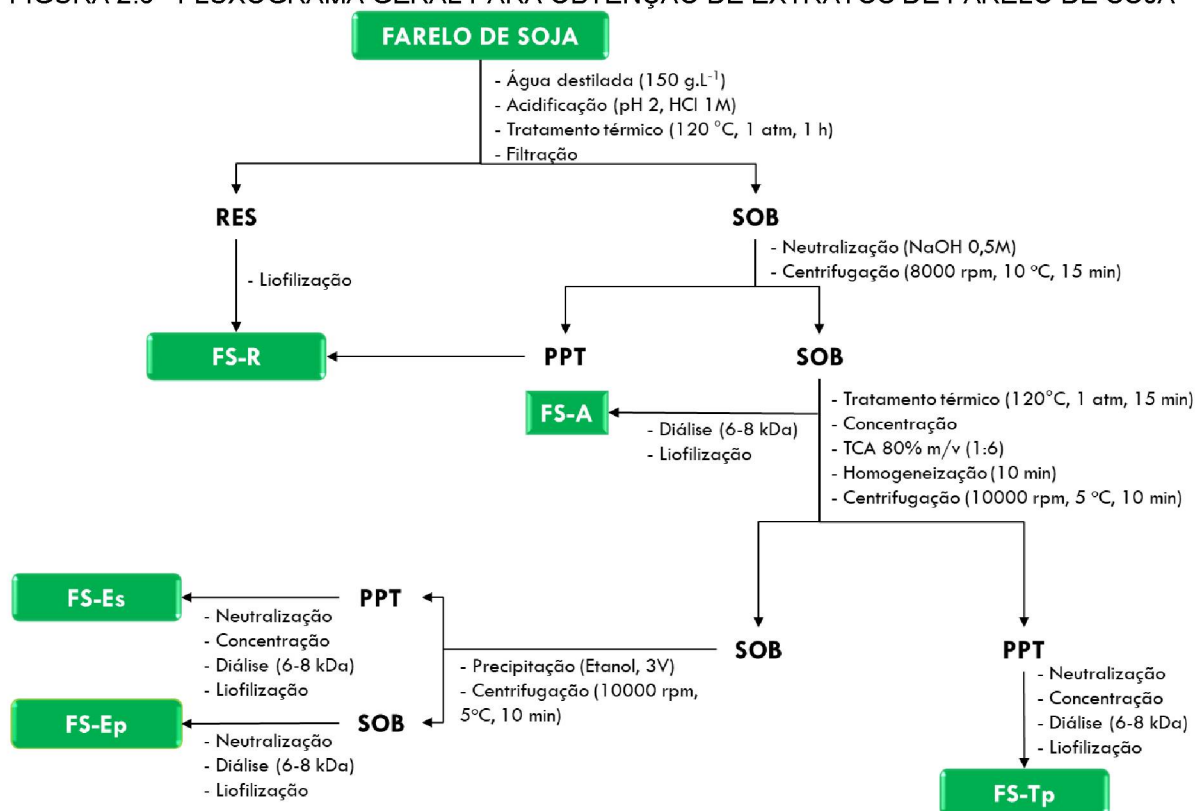
Amostras de farelo de soja (Imcosoy® 46), provenientes da IMCOPA (Importação e Comércio Paraná – Araucária/PR), foram gentilmente cedidas pela empresa BIO4 – Soluções Biotecnológicas. Este farelo de soja é o produto resultante do esmagamento dos grãos de soja destinados à extração de óleo de soja contendo 5% de lipídeos residuais.

2.3.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

O processo de extração do farelo de soja foi conduzido de acordo com Rodrigues (2012). O farelo de soja após suspensão em água destilada ($150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) teve seu pH ajustado para 2,0 com HCl 1 M, e foi submetido a uma pressão relativa de 1 atm, a 120°C por 1 h (tratamento térmico). 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 liofilizado, gerando a fração FS-R. O sobrenadante foi ressubmetido ao processo de tratamento térmico por mais 15 min, e em seguida concentrado até 30% do seu volume original. Uma alíquota, igual a um terço, dessa solução concentrada foi retirada, dialisada contra água destilada em membrana de 6-8 kDa e liofilizada, gerando a fração FS-A. Uma solução de TCA (80% m/v) foi então adicionada na solução restante, numa proporção de 1:6 (uma parte de TCA para seis partes da solução de amostra) para precipitação de proteínas. A mistura foi homogeneizada durante 10 min e centrifugada (10000 rpm, 5°C , 10 min). O precipitado foi ressolubilizado em água destilada, neutralizado, dialisado contra água destilada, em membrana de 6-8 kDa, e liofilizado, originando a fração FS-Tp. Ao sobrenadante foi adicionado três partes de etanol (96°GL; 4°C , 18 h) para precipitação de polissacarídeos. Após centrifugação (10000 rpm, 5°C , 10 min) o precipitado obtido foi ressuspenso em água, neutralizado, dialisado contra água destilada, em membrana de 6-8 kDa, e liofilizado, dando origem à fração FS-Ep. O sobrenadante etanólico após ter seu volume reduzido, foi neutralizado, dialisado contra água destilada em membrana de 6-8 kDa,

e liofilizado, dando origem à fração FS-Es. A retirada dos sais e componentes de menor massa, através de diálises, foi monitorada por condutividade, até valor próximo ao da água destilada. O esquema geral de obtenção dos polissacarídeos quimiotransformados do farelo de soja está apresentado na Figura 2.6.

FIGURA 2.6 - FLUXOGRAMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA



NOTA: RES: Resíduo; PPT: Precipitado; SOB: Sobrenadante.
FONTE: O autor (2016).

2.3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E DAS FRAÇÕES PURIFICADAS

2.3.3.1 Métodos Colorimétricos

2.3.3.1.1 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ou misturas de galactose e ácido galacturônico ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.3.3.1.2 Dosagem de Proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry et al. (1951), que possui intervalo linear entre 5 - $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.3.3.1.3 Dosagem de Ácidos Urônicos

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método do *m*-hidroxibifenil, descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), que possui intervalo linear entre $0,97 - 38,8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.3.3.2 Determinação da Rotação Óptica

A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) foi realizada a 25°C em polarímetro Jasco, modelo P-2000, com as amostras na concentração de 0,2% (m/v) em água destilada. Os valores de rotação óptica específica foram calculados pela seguinte fórmula (Equação 2.1):

$$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = \frac{\alpha \cdot 100}{L \cdot C} \quad (2.1)$$

onde α é a rotação observada em graus (valor obtido no equipamento); L é o comprimento do caminho óptico em decímetros e C é a concentração da solução em g/100 mL.

2.3.3.3 Determinação da Composição Monossacarídica

A composição monossacarídica dos polissacarídeos foi determinada por meio da hidrólise ácida total seguida de derivatização até acetatos de alditóis. Aproximadamente 2 mg das frações obtidas nas extrações foram hidrolisados com 1,0 mL de TFA 2 M, durante 6 h a 100°C (LIAO et al., 2001). Após hidrólise o ácido foi removido por evaporação e os produtos de hidrólise foram ressuspensos 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 pela adição de ácido acético até pH 5,0. O ácido bórico formado foi eliminado por coevaporação 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 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CLG-EM) e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976).

2.3.3.4 Análise de Metilação

O processo de metilação do polissacarídeo foi conduzido de acordo com o método de Ciucanu e Kerek (1984). Após solubilização em DMSO (10,0 mg de polissacarídeo para cada 1,0 mL) foi adicionado NaOH pulverizado (30,0 mg), mantendo esta mistura sob agitação por 30 min. Em seguida, adicionou-se iodometano (0,1 mL) sendo mantida a agitação por mais 30 min. Esse processo de adição de NaOH e iodometano foi repetido mais duas vezes. Seguidamente, a

reação foi interrompida, com água purificada (2 mL), e neutralizada (ácido acético 50%). Os produtos metilados foram dialisados, contra água destilada, liofilizado e ressubmetidos ao processo de metilação. Os produtos foram então hidrolisados (ácido fórmico 45%, 16 h, 100 °C) seguidos por redução com NaBD₄ e acetilação (conforme descrito no item 2.3.3.3). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados, foram analisados por CLG-EM e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976; SASSAKI et al., 2005; CARPITA; SHEA, 1988).

2.3.3.5 Métodos Cromatográficos

2.3.3.5.1 Cromatografia de Exclusão

Objetivando o fracionamento dos polissacarídeos, a fração FS-Ep foi submetida à várias cromatografias de exclusão em coluna de vidro (100 cm x 2,5 cm d.i.) contendo 430 mL de Sepharose 6B (faixa de fracionamento de 1×10^4 a 4×10^6 Da). As eluições foram realizadas utilizando água destilada ou NaCl 1 M como fase móvel e fluxo médio de aproximadamente 0,7 e 1 mL·min⁻¹, respectivamente.

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 7 mL/tubo. A detecção de carboidratos foi acompanhada pelo teste colorimétrico do fenol – ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Após, todas as frações foram congeladas e liofilizadas. As frações obtidas utilizando NaCl como fase móvel foram dialisadas contra água destilada em membranas de 6-8 kDa antes de seguirem para liofilização.

2.3.3.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A amostra FS-EpA (fração obtida após fracionamento por cromatografia de exclusão) foi submetida à cromatografia em camada delgada, de modo a identificar a identidade do açúcar ácido presente nesta fração. A análise de CCD foi realizada em placa de sílica gel (Sigma-Aldrich) com 10 cm de altura total. As amostras foram hidrolisadas (TFA 2 M, 6 h, 100°C). Após hidrólise o ácido foi removido por

evaporação; os produtos de hidrólise foram ressuspenidos em H₂O na concentração de 20 mg·mL⁻¹ e, utilizando capilares, 8 microgotas foram aplicados na placa. Foi utilizado como fase móvel uma mistura de acetato de etila:ácido acético:*n*-propanol:água (4:2:2:1, v/v) e como revelador orcinol:H₂SO₄ (0,2 g de orcinol, em 95 mL de etanol e 5 mL de H₂SO₄) (Stahl, 1969). Padrões de ácido galacturônico e ácido glucurônico (10 mg·mL⁻¹, 2 microgotas) foram utilizados para comparação dos fatores de retenção (R_f).

2.3.3.5.3 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CLG-EM)

Os componentes monossacarídicos foram quantificados utilizando através de cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massas da marca SATURN 2000R, modelo ITD 800, (tipo íon trap), equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 d.i.), revestida internamente com a fase estacionária DB-225. As injeções no cromatógrafo foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura num gradiente de 40°C por minuto, até 230°C, mantendo-se constante a partir deste valor. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL·min⁻¹. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, abrangendo fragmentos com relação massa/carga (*m/z*) variando de 40 a 300. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972) sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons comparados com padrões descritos na literatura (CARPITA, 1989).

2.3.3.5.4 Cromatografia Líquida de Permeação em Gel ou Exclusão Estérica

2.3.3.5.4.1 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 (NaNO_2 0,1 M) e azida sódica (NaN_3 200 ppm) numa concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo filtradas em membrana Millipore (éster de celulose ou acetato de celulose) com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$.

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 - *Multi Angle Laser Light Scattering*) 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[™] 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 por uma 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.

2.3.3.5.4.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) acoplada aos detectores de índice de Refração Diferencial (RID) e de espalhamento de luz à 7° (LALLS) e 90° (RALLS)

Amostras que não foram detectadas por HPSEC-MALLS/RID foram analisadas por um cromatógrafo líquido GPC, Viscotek Dual equipado com colunas de polimetacrilato da Shodex-OHPak SB-806 HQ, com limite de exclusão de

$2 \times 10^7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, conectadas em série. O cromatógrafo é acoplado a multidetectores: um refratômetro diferencial (RID) da Viscotek modelo VE3580; um detector de espalhamento de luz laser, modelo 270 Dual Detector (Viscotek), contínuo por baixo ângulo a 7° (LALLS – Low Angle Laser Light Scattering) e ângulo de 90° (RALLS - Right Angle Laser Light Scattering) com comprimento de onda de 632,8 nm, em 30°C , usando como eluente soluções de nitrito de sódio 0,1 M, contendo azida de sódio 200 ppm num fluxo de $0,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. As amostras foram solubilizadas no mesmo eluente, em concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$. A calibração do equipamento foi realizada com padrões de óxido de polietileno ($23000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) e dextrana ($70000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

2.3.3.6 Métodos Espectroscópicos

1.1.1 Ressonância Magnética Nuclear Monodimensional (^1H , ^{13}C , DEPT-135) e Bidimensional (HSQC, COSY e TOCSY)

As frações solúveis foram analisadas por ressonância magnética nuclear (RMN) mono e bidimensionais, com o objetivo de identificar as estruturas presentes nessas frações. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, com uma sonda de 5 mm (*widebore probe*). As amostras foram solubilizadas em água deuterada (D_2O , 99%), em concentrações de $80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para as análises de ^{13}C e DEPT-135, e $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para as análises de ^1H e RMN bidimensionais, com temperaturas entre $50\text{-}70^\circ\text{C}$. 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 de RMN de ^{13}C (desacoplado) e ^1H foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz e 400,13 MHz, respectivamente.

2.3.3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear de Estado Sólido

As frações insolúveis foram analisadas por RMN em estado sólido, com o objetivo de identificar as estruturas presentes nessas frações. Os espectros de ressonância magnética nuclear usando a técnica CP/MAS, Polarização Cruzada sob

Rotação de Ângulo Mágico (*Cross Polarization with Magic Angle Spinning*) foram adquiridos num espectrômetro Bruker AVANCE 400 operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de ^{13}C a 100,62 MHz, equipado com uma sonda multinuclear para sólidos (MAS) de 4 mm com giro no ângulo mágico. Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos por polarização cruzada com o tempo de contato de 2,0 ms (utilizando amplitude variável 50-100%), desacoplamento de alta potência durante aquisição por pulsos compostos (tipo: spinal64) de 0,2 ms e tempo de recuperação de 5,0 s. Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos com 2 k pontos, acúmulo de 2 k promediações para cada amostra e girando as amostras a 5 kHz. Os espectros foram processados pela aplicação de uma multiplicação exponencial nos FIDs por um fator de 50 Hz, seguido da Transformada de Fourier com 4 k pontos, respectivamente.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

O farelo de soja após diluído em água destilada e ajuste do pH inicial da solução (6,5) para 2,0, foi submetido ao tratamento termoquímico por 1 h. Após este tratamento, o material foi filtrado, neutralizado e centrifugado. O precipitado obtido foi reunido ao material retido anteriormente na filtração e liofilizado, gerando a fração FS-R (60,4% m/m de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). O sobrenadante foi ressubmetido ao tratamento termoquímico por mais 15 min, seguido por redução de volume. Parte dessa solução concentrada foi alíquotada, dialisada e liofilizada gerando a fração FS-A (7,9% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). Após adição de TCA na solução restante, a mistura foi homogeneizada e centrifugada. O precipitado obtido foi ressuspensão em água, neutralizado, dialisado e liofilizado, originando a fração FS-Tp (2,8% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). Ao sobrenadante foi adicionado etanol e após centrifugação o precipitado etanólico obtido foi ressuspensão em água, neutralizado, dialisado e liofilizado, originando a fração FS-Ep (2,5% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja). O sobrenadante etanólico foi neutralizado e após redução do volume, foi dialisado e liofilizado, dando origem à fração FS-Es (0,9% de rendimento em relação à massa seca de farelo de soja).

2.4.2 ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Todas as frações obtidas foram analisadas comparativamente (Tabela 2.2) quanto a rendimento, teor de proteínas, teor de carboidratos totais e composição monossacarídica.

A fração FS-R, correspondente ao resíduo da extração aquosa, apresentou o maior rendimento do processo, 60,4% m/m. Esse alto rendimento pode indicar que o processo de extração não foi totalmente efetivo, dessa forma o resíduo pode ser ressubmetido a um novo processo de extração. Em trabalho anterior, a submissão do resíduo a um novo ciclo de extração resultou em 23% de aumento no rendimento total (RODRIGUES, 2012).

TABELA 2.2 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
FS-R	60,4	62,5	22,0	5,9	2,4	15,9	19,1	8,3	27,5	15,7	5,2
FS-A	7,9	39,1	37,2	tr	tr	24,5	3,5	2,1	46,9	4,0	19,0
FS-Tp	2,8	86,8	8,7	1,8	2,8	13,9	2,9	22,9	5,6	21,3	28,7
FS-Ep	2,5	4,7	85,0	8,3	1,0	15,2	5,8	2,0	28,4	6,8	32,5
FS-Es	0,9	58,0	21,2	1,3	tr	10,2	tr	tr	2,6	tr	85,8

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; FS-R: Resíduo da extração de farelo de soja; FS-A: Extrato aquoso de farelo de soja; FS-Tp: Fração insolúvel obtida após tratamento com TCA; FS-Ep: Fração polissacarídica obtida após precipitação com TCA e etanol; FS-Es: Fração do sobrenadante etanólico obtido após precipitação com TCA e etanol. ^a Rendimento relativo a massa seca inicial de farelo de soja (% m/m); ^b Lowry et al. (1951); ^c Dubois et al. (1956); ^d Monossacarídeos neutros quantificados como acetato de alditóis; ^e Filizetti-Cozzi; Carpita (1991); tr: percentagem menor ou igual a 1,0%.

FONTE: O autor (2016).

A fração FS-A apresentou rendimento de 7,9% m/m. As demais frações, FS-Tp, FS-Ep e FS-Es apresentaram baixos rendimentos, entre 0,9 – 2,8% m/m. Isso é decorrente das etapas de purificação inseridas ao processo de extração, obtendo-se, por fim, frações de baixo rendimento, porém com maior teor de pureza. Todos os rendimentos foram semelhantes aos obtidos por Rodrigues (2012), quando as mesmas condições de extração foram aplicadas, atingindo rendimentos de 13,4% e 1,5% m/m para o extrato bruto e fração polissacarídica, respectivamente (RODRIGUES, 2012).

Observa-se, através da Tabela 2.2, que ocorreu grande perda de massa durante o processo, 26,5% m/m. Essa perda é decorrente das várias etapas de diálises realizadas durante todo o processo. Estudos de otimização podem ser realizados, de modo a aumentar o rendimento das frações de interesse e diminuir a perda de massa resultante.

A fração FS-A, correspondente ao extrato bruto de farelo de soja, apresentou teor de carboidratos e proteínas de 39,1 e 37,2%, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos descritos por Honig e Rackis (1979), Bairy et al. (2008) e Giannoccaro, Wang e Chen (2006), que para o extrato bruto, obtido a partir de farelo de soja, encontraram teores próximos a 40% para carboidratos e 50% para proteínas.

A fração polissacarídica FS-Ep apresentou alto teor de carboidratos, 85,0%, em decorrência do tratamento com TCA ao qual esta fração foi submetida, de modo

que as proteínas foram precipitadas, concentrando os carboidratos no sobrenadante. Nota-se ainda, que a fração correspondente ao precipitado etanólico (FS-Ep) apresentou teor de carboidratos totais superiores à fração correspondente ao sobrenadante etanólico (FS-Es: 21,2%). O inverso aconteceu para o teor de proteínas, onde a fração FS-Es apresentou teor mais elevado em comparação com FS-Ep, 58,0 e 4,7%, respectivamente. A fração FS-Tp, como esperado, apresentou alto teor de proteínas e baixo teor de carboidratos, 86,8 e 8,7%, respectivamente, comprovando a eficiência do tratamento com TCA + etanol para precipitação de proteínas.

Observa-se a partir dos resultados obtidos que o tratamento térmico aplicado ao farelo de soja foi efetivo para extração de frações ricas em carboidratos. Extrações aquosas de farelo de soja realizadas em temperatura ambiente e 80°C, sem ajuste de pH, não apresentam a mesma eficácia para a extração de polissacarídeos, conforme resultados evidenciados por Rodrigues (2012). As frações nativas, extraídas sem tratamento térmico, eram compostas por altos teores de proteínas (> 66%) e baixos teores de carboidratos (< 8,2%), sendo estes, oligossacarídeos, majoritariamente sacarose.

Majoritariamente, a composição monossacarídica das frações obtidas apresentou arabinose, galactose e ácidos urônicos como constituintes monossacarídicos principais, sugerindo a presença de pectinas no farelo de soja. A presença de arabinose, galactose e ácidos urônicos tem sido amplamente evidenciada para soja e seus derivados (MORITA, 1965; ASPINALL; BEGBIE et al., 1967; ASPINALL, COTTRELL et al., 1967; LABAVITCH; FREEMAN; ALBERSHEIM, 1976; BRILLOUET; CARRÉ, 1983; ASPINALL, 1988; YAMAGUCHI; OTA; HATANAKA, 1996; FURUTA, TAKAHASHI; TOBE; KIWATA et al., 1998; HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998; FRANSEN et al., 2000; NAKAMURA et al., 2001; NAKAMURA et al., 2002a; b; CIPRIANI et al., 2009; LI et al., 2009; TSUBAKI et al., 2009).

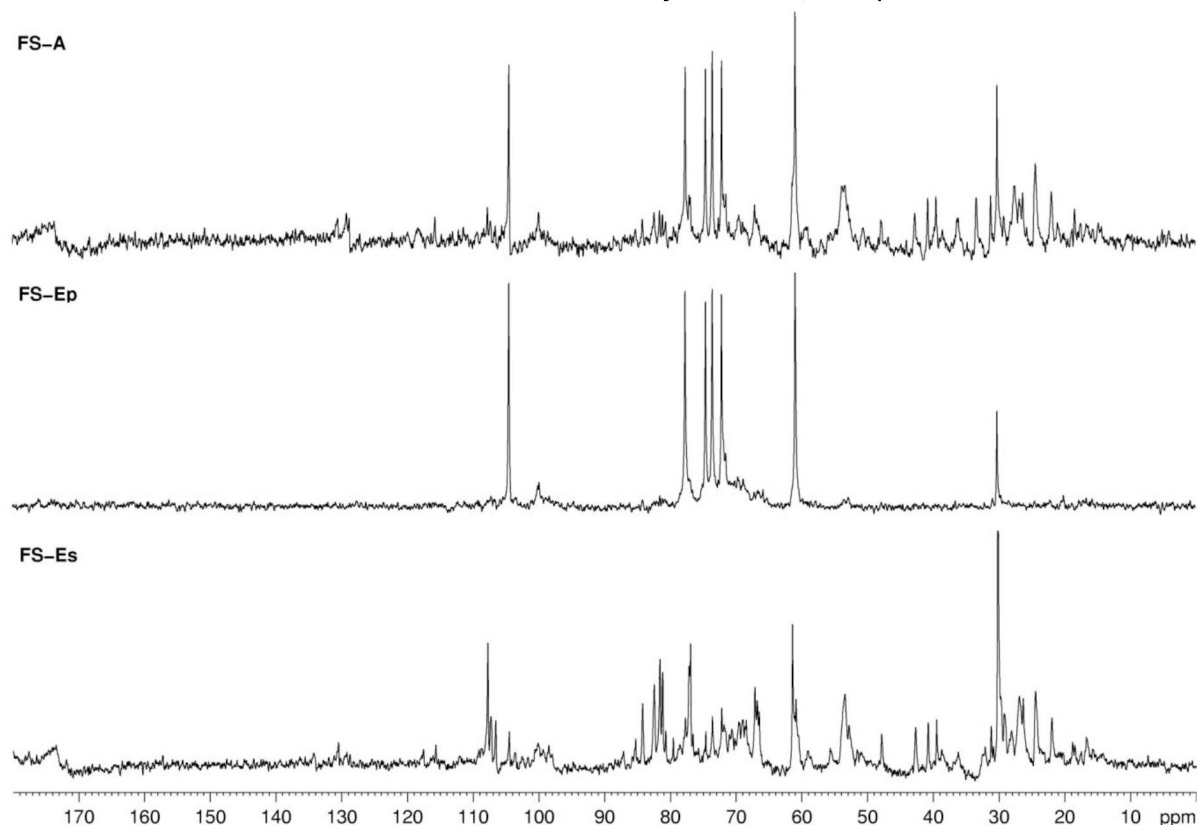
Nas frações FS-R e FS-Tp a glucose, xilose e manose aparecem em quantidades significativas. Outros monossacarídeos foram também encontrados em menores quantidades. A presença de glucose, manose e xilose já foram evidenciadas anteriormente (WHISTLER; SAARNIO, 1957; ASPINALL; HUNT; MORRISON, 1966; FURUTA, TAKAHASHI; TOBE; KIWATA et al., 1998; HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998; HUISMAN et al., 2000; LIAO et al., 2001; WU et al.,

2011; LIU et al., 2015). A presença de manose pode indicar presença de cascas de soja, uma vez que estas consistem majoritariamente de galactomananas (WHISTLER; SAARNIO, 1957).

2.4.3 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As frações FS-A, FS-Ep e FS-Es foram analisadas e comparadas por RMN de ^{13}C (Figura 2.7). Observa-se, nas frações FS-A e FS-Es, sinais característicos de proteínas: 40-10, 55-50, 135-115 e 180-170 ppm, correspondentes a cadeias laterais alifáticas, carbonos- α , carbonos aromáticos e carbonos carbonílicos, respectivamente (OPELLA; FREY; CROSS, 1979; ZERI et al., 1996). Além dessas regiões, visualiza-se sinais intensos característicos de carboidratos, entre 110 e 60 ppm. Essas informações corroboram com as dosagens colorimétricas, uma vez que a fração FS-Ep apresentou maior teor de carboidratos e menores teores de proteínas quando comparada às frações FS-A e FS-Es.

FIGURA 2.7 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES FS-A, FS-Ep E FS-Es

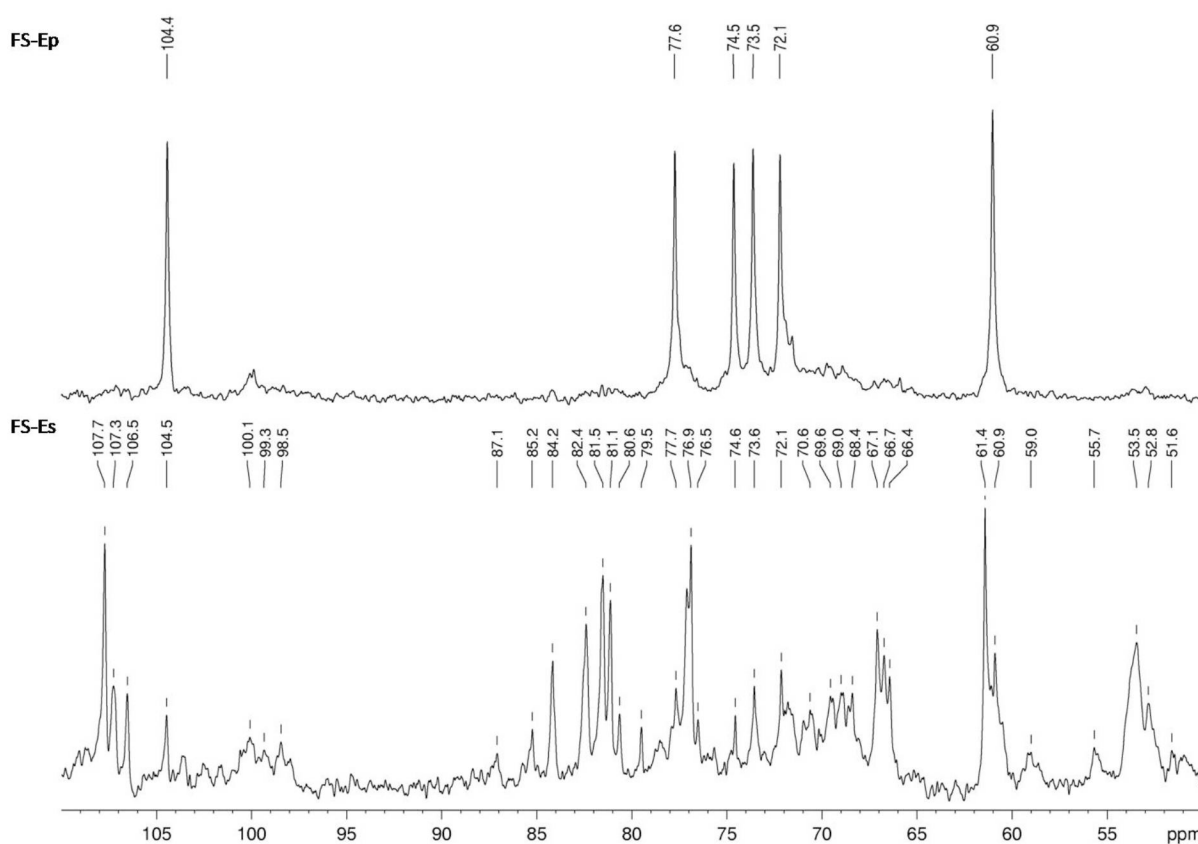


NOTA: Solvente: D_2O (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm).

FONTE: O autor (2016).

Na Figura 2.8 são comparados os espectros de RMN ^{13}C das frações FS-Ep e FS-Es. A região anomérica (110 – 90 ppm) apresenta um sinal intenso em 104,4 ppm correspondente ao C-1 das unidades de $\beta\text{-D-Galp}$ (FRANSEN et al., 2000; CIPRIANI et al., 2004; LIMA, 2008). São observados também 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 $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}$ -ligadas (GORIN; MAZUREK, 1975; FRANSEN et al., 2000; LIMA, 2008; CIPRIANI et al., 2009).

FIGURA 2.8 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES FS-Ep E FS-Es



NOTA: Solvente: D_2O (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm).
 FONTE: O autor (2016).

Destaca-se, na fração FS-Es a redução do sinal em 104,5 ppm referente às unidades de $\beta\text{-D-Galp}$ (FRANSEN et al., 2000; CIPRIANI et al., 2004; LIMA, 2008); e sinais mais evidentes em 107,7; 107,3 e 106,5 ppm atribuídos às unidades de $\alpha\text{-L-Araf}$ (FRANSEN et al., 2000; CIPRIANI et al., 2004; CAPEK et al., 2010; GOLLNER; BLASCHEK; CLASSEN, 2010). Também é possível identificar sinais correspondentes a unidades de $\alpha\text{-D-GalpA}$ (100,1 e 99,3 ppm, respectivos ao C-1 das unidades esterificadas e não esterificadas) (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO et al., 2006; VRIESMANN, 2011). Observa-se ainda, sinais em 173,4

ppm referentes aos grupos carboxílicos livres do ácido galacturônico (C-6) (DELGOBO et al., 1999; CIPRIANI et al., 2004; COZZOLINO et al., 2006). Os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos ressonam em 52,8 ppm (COZZOLINO et al., 2006; MARIA-FERREIRA et al., 2013). Sinais na região entre 84 e 80 ppm podem ser atribuídos a C-2, C-3 ou C-4, das unidades de α -L-Araf e em 67,3 ppm ao C-5 substituído das unidades de α -L-Araf (1 \rightarrow 5) ligadas (FRANSEN et al., 2000; CAPEK et al., 2010). Esses dados corroboram com os dados de composição monossacarídica, sugerindo a presença de uma homogalacturonana substituída por unidades de arabinose.

A fração FS-Tp, embora com baixo teor de carboidratos foi, assim como as demais, analisada por ressonância magnética nuclear. No entanto, em função da sua alta insolubilidade empregou-se uma técnica de RMN em estado sólido utilizando Polarização Cruzada sob Rotação de Ângulo Mágico (CP/MAS) (Figura 2.9). Observam-se sinais com aspectos alargados, correspondentes a proteínas. Os sinais entre 185 - 165 ppm correspondem aos carbonos carbonílicos da cadeia principal e grupos carboxílicos da cadeia lateral de aminoácidos ácidos; os sinais entre 135 - 115 ppm são atribuídos aos carbonos da cadeia lateral de aminoácidos aromáticos; entre 65 - 45 ppm e 45 - 25 ppm são atribuídos aos carbonos α e β , respectivamente; e os sinais entre 25 - 15 ppm correspondem aos grupos metil e metileno distantes da cadeia principal (MIZUNO et al., 2000; KEALLEY et al., 2008; MA et al., 2015).

FIGURA 2.9 - ESPECTRO DE RMN CP/MAS ^{13}C DA FRAÇÃO FS-Tp



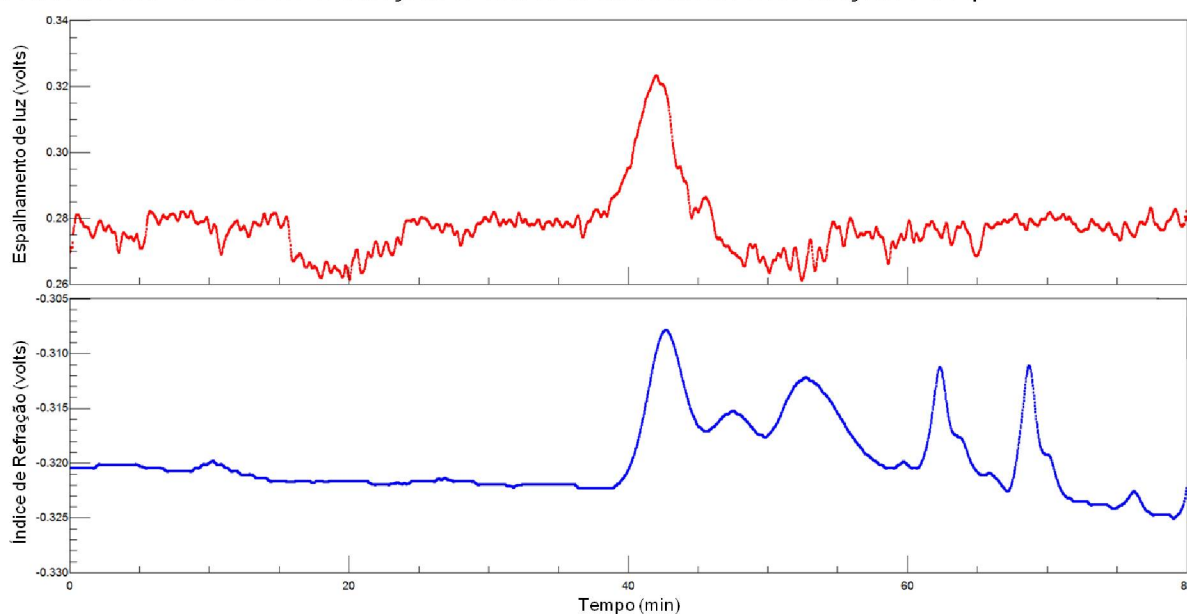
FONTE: O autor (2016).

Em razão da fração FS-Ep apresentar o maior teor de carboidratos, esta foi escolhida para realização das análises subsequentes dos polissacarídeos quimiotransformados.

2.4.4 ANÁLISE POR HPSEC-MALLS-RID

A fração FS-Ep foi submetida à análise de homogeneidade em sistema cromatográfico de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-RID) (Figura 2.10). Por meio do detector de índice de refração é possível visualizar um perfil cromatográfico heterogêneo, polidisperso, indicando a presença de massas moleculares diferentes, eluindo após os 40 min. O pico centrado em torno de 42,5 min foi detectado por ambos os detectores, indicando ser constituído por moléculas de alta massa molar em grande concentração. Picos detectados pelo detector de índice de refração em 48 e 53 min não foram detectados pelo detector de espalhamento de luz, indicando alta concentração, porém baixa massa molecular. Pico próximo a 70 min (volume total do sistema cromatográfico) indica a presença de traços de sal na amostra.

FIGURA 2.10 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC-MALLS/RID DA FRAÇÃO FS-Ep



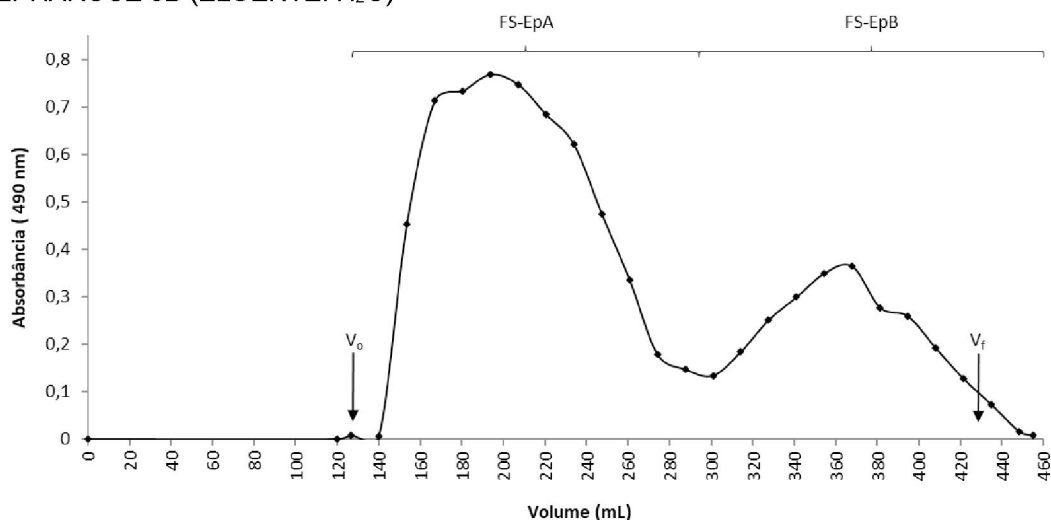
FONTE: O autor (2016).

2.4.5 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO FS-Ep

Com o objetivo de se obter uma fração polissacarídica homogênea, a fração FS-Ep foi submetida a fracionamento utilizando cromatografia de exclusão em coluna de Sepharose 6B, tendo água destilada como eluente. O perfil de eluição mostrado na Figura 2.11 indica que a fração FS-Ep é constituída por dois grupos de moléculas, permitindo assim a separação em duas novas subfrações, FS-EpA e FS-EpB. A subfração de maior rendimento, FS-EpA, representando 69,7% do material recuperado, apresenta um pico bastante alargado, sugerindo a presença de uma fração polissacarídica polidispersa. O percentual de recuperação total médio das frações nesta coluna foi de 68,3% relativo à massa polissacarídica inicial aplicada.

Para permitir a obtenção de uma quantidade de amostra suficiente das duas subfrações para as análises posteriores, várias alíquotas da fração FS-Ep foram cromatografadas. Como esperado, todos os perfis de eluição obtidos se mostraram bastante semelhantes (resultados não mostrados).

FIGURA 2.11 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO FS-Ep EM SEPHAROSE 6B (ELUENTE: H₂O)



FONTE: O autor (2016).

As subfrações foram também comparadas quanto às suas composições monossacarídicas (Tabela 2.3). Observa-se que a fração FS-EpA apresentou como componentes majoritários: ácido urônico e galactose. Já a fração FS-EpB é constituída majoritariamente por galactose. Outros monossacarídeos estão

presentes em ambas as frações, em menores quantidades. Análise de rotação óptica específica indica valores de $+72^\circ$ e $+56,2^\circ$ para as frações FS-EpA e FS-EpB, respectivamente, compatíveis com polímeros compostos majoritariamente por moléculas na conformação enantiomérica da série D.

TABELA 2.3 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO BRUTA FS-Ep

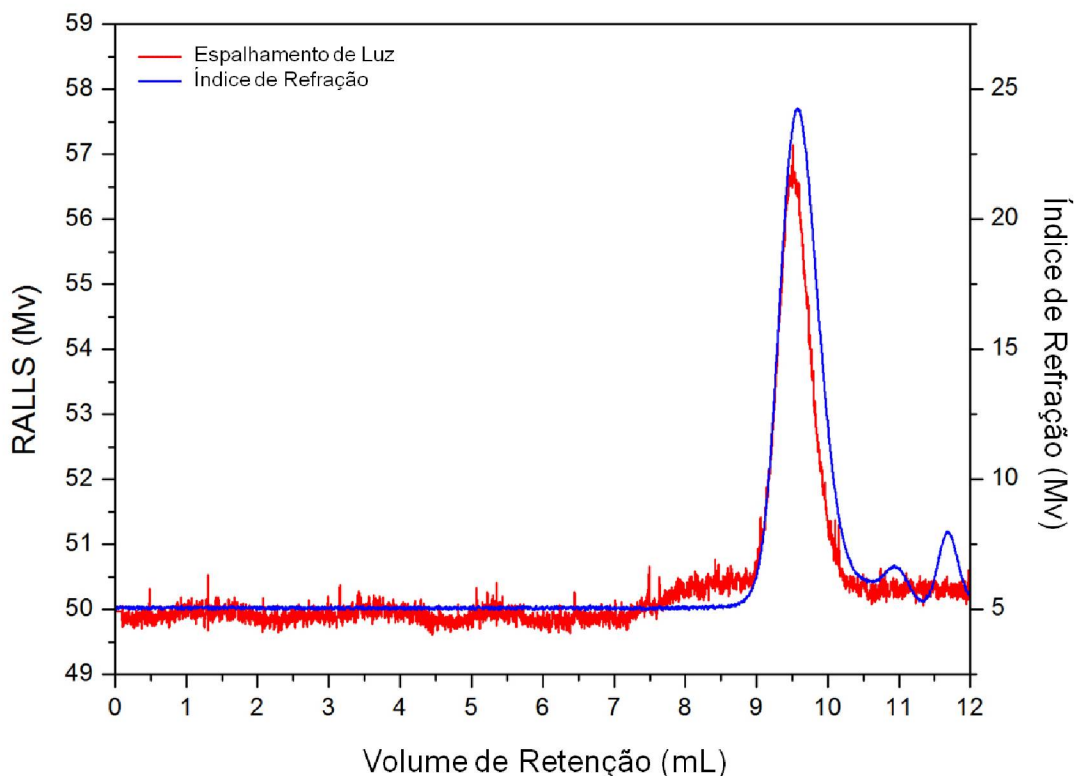
Fração	Rendimento (%)	PTN (%) ^c	Carboidratos Totais (%) ^d	Composição Monossacarídica (mol%) ^e								[α] _D ^g
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^f	
FS-Ep	2,5 ^a	4,7	85,0	8,3	1,0	15,2	5,8	2,0	28,4	6,8	32,5	+68,5
FS-EpA	69,7 ^b	3,3	93,9	4,1	1,9	5,7	4,8	-	38,3	7,3	37,9	+72,0
FS-EpB	30,3 ^b	4,8	95,9	-	-	8,5	tr	-	73,4	14,8	3,3	+56,2

NOTA: PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; FS-Ep: Fração polissacarídica obtida após precipitação com TCA e etanol; FS-EpA e FS-EpB: Frações eluídas com água destilada durante fracionamento cromatográfico da fração FS-Ep em Sepharose 6B. ^a Rendimento relativo a massa seca inicial de farelo de soja (% m/m); ^b Rendimentos relativos à fração de origem FS-Ep (% m/m); ^c Lowry et al. (1951); ^d Dubois et al. (1956); ^e Monossacarídeos neutros quantificados como acetato de alditóis; ^f Filizetti-Cozzi; Carpita (1991); ^g [α]_D: Rotação óptica específica, determinada a 25°C em soluções aquosas 0,2% (m/v); tr: percentagem menor ou igual a 1,0%; -: não detectado.

FONTE: O autor (2016).

A fração FS-EpB, foi analisada por HPSEC-MALLS/RID, no entanto o detector de espalhamento de luz permaneceu instável durante a análise (dados não apresentados). O processo de extração conduziu à produção de frações de baixa massa molecular de forma que o detector-multiângulos (MALLS) não foi capaz de detectar tais moléculas. Assim, optou-se por verificar a homogeneidade dessa fração em outro cromatógrafo com uma configuração mais adequada para detectar moléculas de baixa massa molar. Nesse caso foi utilizado um cromatógrafo acoplado a detector de espalhamento de luz estático a 90° (RALLS) e de índice de refração (GPC-RALLS/RID). É possível observar que a fração apresenta caráter homogêneo, sendo detectada por ambos os detectores, apresentando um pico máximo em 9,5 mL, próximo ao volume final do sistema cromatográfico (Figura 2.12).

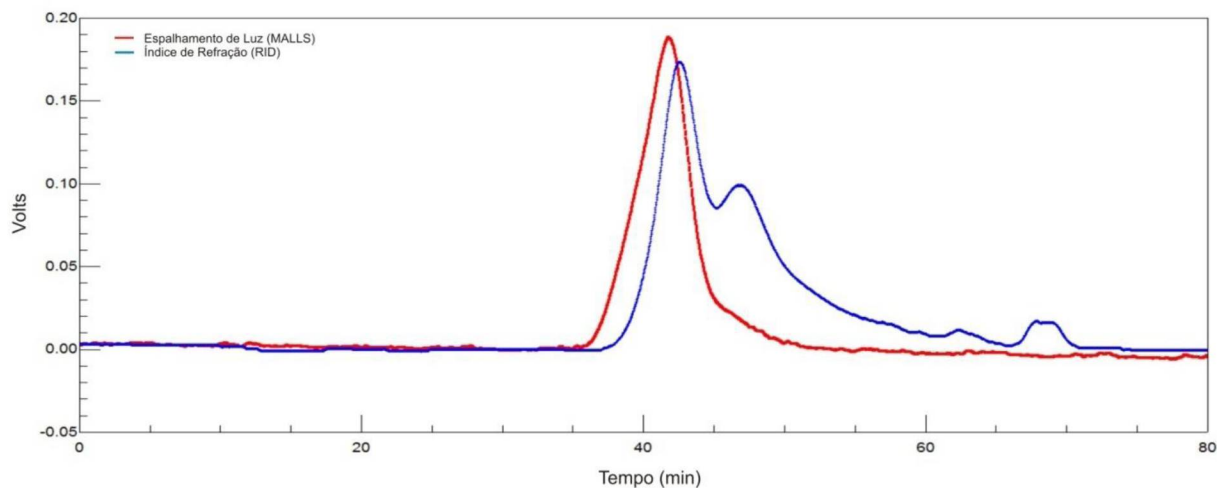
FIGURA 2.12 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (GPC-RALLS/RID) DA FRAÇÃO FS-EpB



FONTE: O autor (2016).

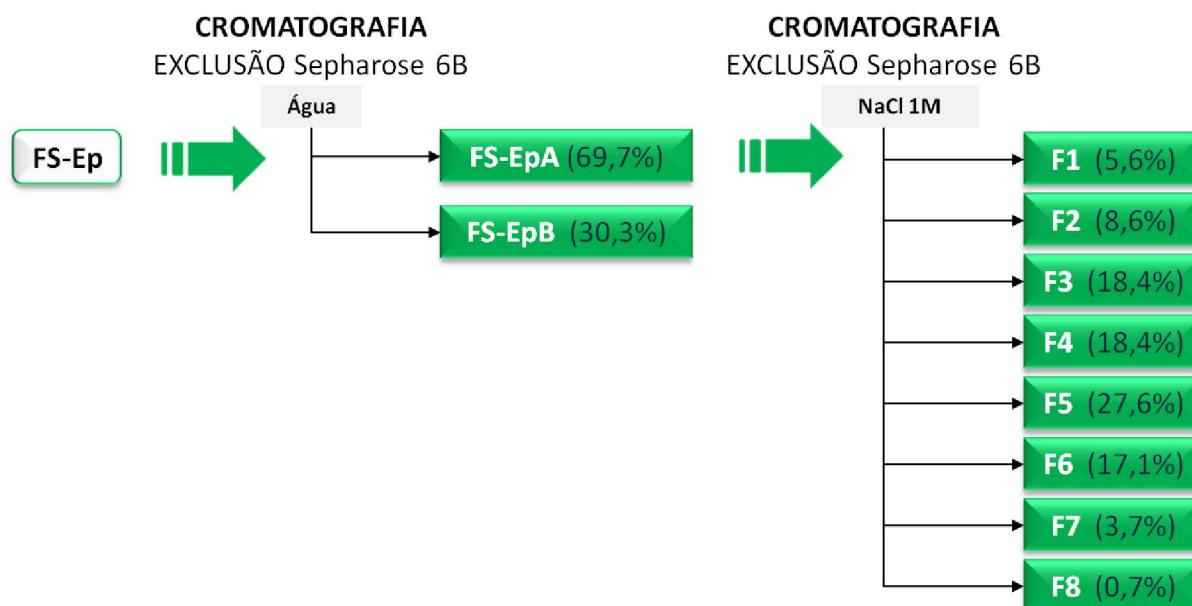
A fração de maior rendimento, FS-EpA, diferentemente, apresentou um perfil assimétrico (Figura 2.13) em HPSEC-MALLS/RID, sendo dessa forma submetida a uma nova cromatografia de exclusão, em coluna contendo Sepharose 6B, utilizando NaCl 1M como fase móvel (Figura 2.14).

FIGURA 2.13 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS/RID) DA FRAÇÃO FS-EpA



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 2.14 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO FS-Ep POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO

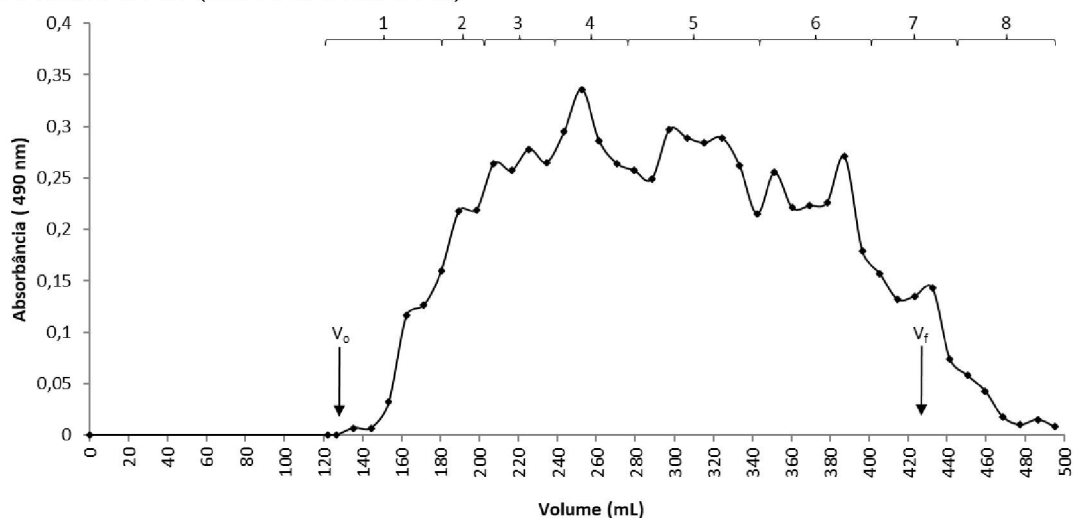


NOTA: Rendimentos expressos em porcentagem em relação à massa seca total recuperada em cada etapa (% m/m).

FONTE: O autor (2016).

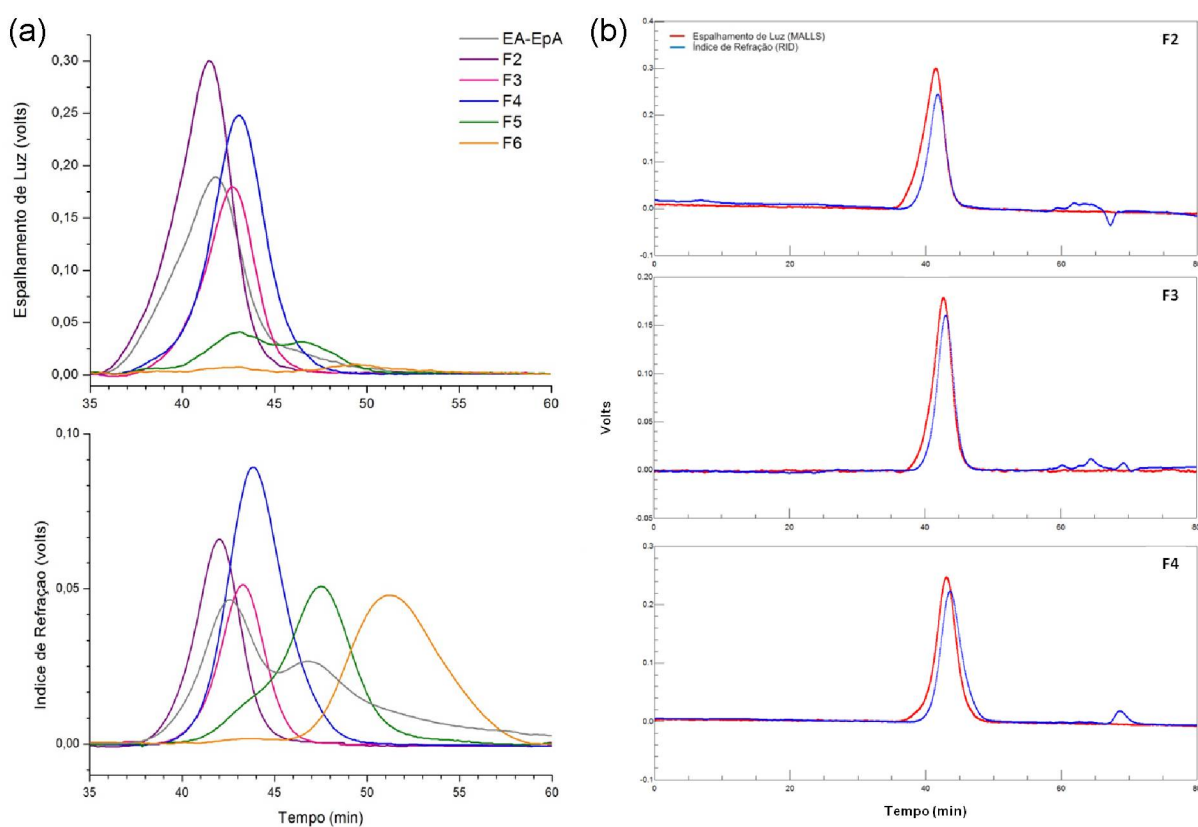
É interessante observar que a fração FS-EpA mostrou novamente um perfil altamente polidisperso (Figura 2.15), maior ainda que aquele observado na cromatografia utilizando H₂O como eluente (Figura 2.11). Esse perfil poderia ser explicado pela presença de agregados moleculares que foram desfeitos pela força iônica do eluente (NaCl 1 M). O eluato foi dividido arbitrariamente em 8 subfrações (F1-F8). Dentre as subfrações obtidas após refractionamento de FS-EpA, apenas aquelas de maior rendimento, F2 (8,6%), F3 (18,4%), F4 (18,4%), F5 (27,6%) e F6 (17,1%), foram submetidas à análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR (Figura 2.16a). É possível observar que as frações F2, F3 e F4 apresentam perfis cromatográficos homogêneos (Figura 2.16b). A fração F5 apresentou-se heterogênea, sendo possível visualizar dois picos, em 43 e 47 min, indicando que esta amostra possivelmente contém resíduos da fração anterior F4. A fração F6 foi apenas detectada pelo índice de refração, sugerindo uma molécula de baixa massa molecular.

FIGURA 2.15 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO FS-EpA EM SEPHAROSE 6B (ELUENTE: NaCl 1 M)



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 2.16 - PERFIL DE ELUIÇÃO HPSEC-MALLS/RID DA FRAÇÃO FS-EpA E SUBFRAÇÕES (a); FRAÇÕES HOMOGÊNEAS F2, F3 E F4 (b)



FONTE: O autor (2016).

A massa molecular ponderal média (M_w) de todas as frações homogêneas obtidas por processo de cromatografia de exclusão foi determinada baseando-se na

taxa de variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc), calculada com auxílio do Software ASTRA (Tabela 2.4).

TABELA 2.4 - MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M_w) CALCULADA PARA AS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS

Fração	dn/dc^a	M_w (kDa)
F2	0,162	700,6
F3	0,148	540,3
F4	0,143	395,6
FS-EpB	0,155	8,7

NOTA: F2-4: Frações eluídas com NaCl 1 M durante fracionamento cromatográfico da fração FS-EpA em Sepharose 6B; FS-EpB: Fração eluída com água destilada durante fracionamento cromatográfico da fração FS-Ep em Sepharose 6B. ^a Taxa de variação do índice de refração com relação a concentração de cada fração (calculadas utilizando o Software ASTRA).

FONTE: O autor (2016).

Todas as subfrações, obtidas após refracionamento de FS-EpA, foram comparadas quanto à composição monossacarídica (Tabela 2.5). Observa-se que assim como a fração mãe, todas as subfrações apresentam galactose e ácido urônico como componentes majoritários. Cromatografia em camada delgada do hidrolisado total da fração F3 indicou que o ácido urônico corresponde ao ácido galacturônico (Figura 2.17), resultado em acordo com Aspinall, Begbie, et al., 1967. Todas as frações apresentam também consideráveis teores de arabinose, xilose e ramnose. Diferentemente das demais frações, a fração F8, de menor rendimento, contém manose além dos demais monossacarídeos, e alto conteúdo de glucose. É possível observar uma semelhança entre as frações F1 a F5, juntas correspondem a aproximadamente 80% do total da fração original. Por essa razão essas frações foram escolhidas para as análises subsequentes de RMN.

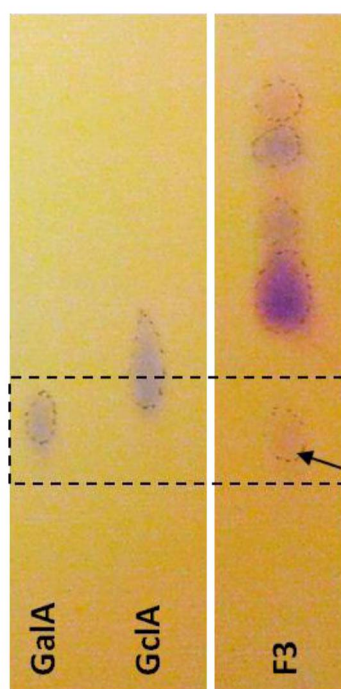
TABELA 2.5 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO FS-EpA

Fração	Rendimento (%) ^a	Composição Monossacarídica (mol%) ^c							
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^d
FS-EpA	69,7 ^b	4,1	1,9	5,7	4,8	-	38,3	7,3	37,9
F1	5,6	7,5	5,3	11,6	12,0	-	40,4	-	23,2
F2	8,6	7,3	4,4	8,9	9,5	-	42,8	2,2	24,9
F3	18,4	7,3	4,3	7,0	8,8	-	48,3	-	24,3
F4	18,4	8,5	4,8	11,5	10,1	-	46,5	-	18,6
F5	27,6	7,3	3,3	12,5	8,6	-	49,8	1,2	17,3
F6	17,1	6,3	4,5	9,2	11,5	-	43,5	17,2	7,6
F7	3,7	4,9	5,5	14,6	10,0	1,4	18,0	15,2	30,4
F8	0,7	5,5	3,2	10,5	13,5	7,1	41,7	18,5	-

NOTA: UA: Ácido Urônico; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; FS-EpA: Fração eluída com água destilada durante fracionamento cromatográfico da fração FS-Ep em Sepharose 6B; F1-8: Frações eluídas com NaCl 1 M durante fracionamento cromatográfico da fração FS-EpA em Sepharose 6B. ^a Rendimentos relativos à fração de origem FS-EpA (% m/m); ^b Rendimento relativo à fração de origem FS-Ep (% m/m); ^c Monossacarídeos neutros quantificados como acetato de alditóis; ^d FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991); tr: percentagem menor ou igual a 1,0%; -: não detectado.

FONTE: O autor (2016).

FIGURA 2.17 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA A FRAÇÃO F3 APÓS HIDRÓLISE TOTAL. GaIA: ÁCIDO GALACTURÔNICO; GcIA: ÁCIDO GLUCURÔNICO. EM DESTAQUE REGIÃO CORRESPONDENTE À GaIA

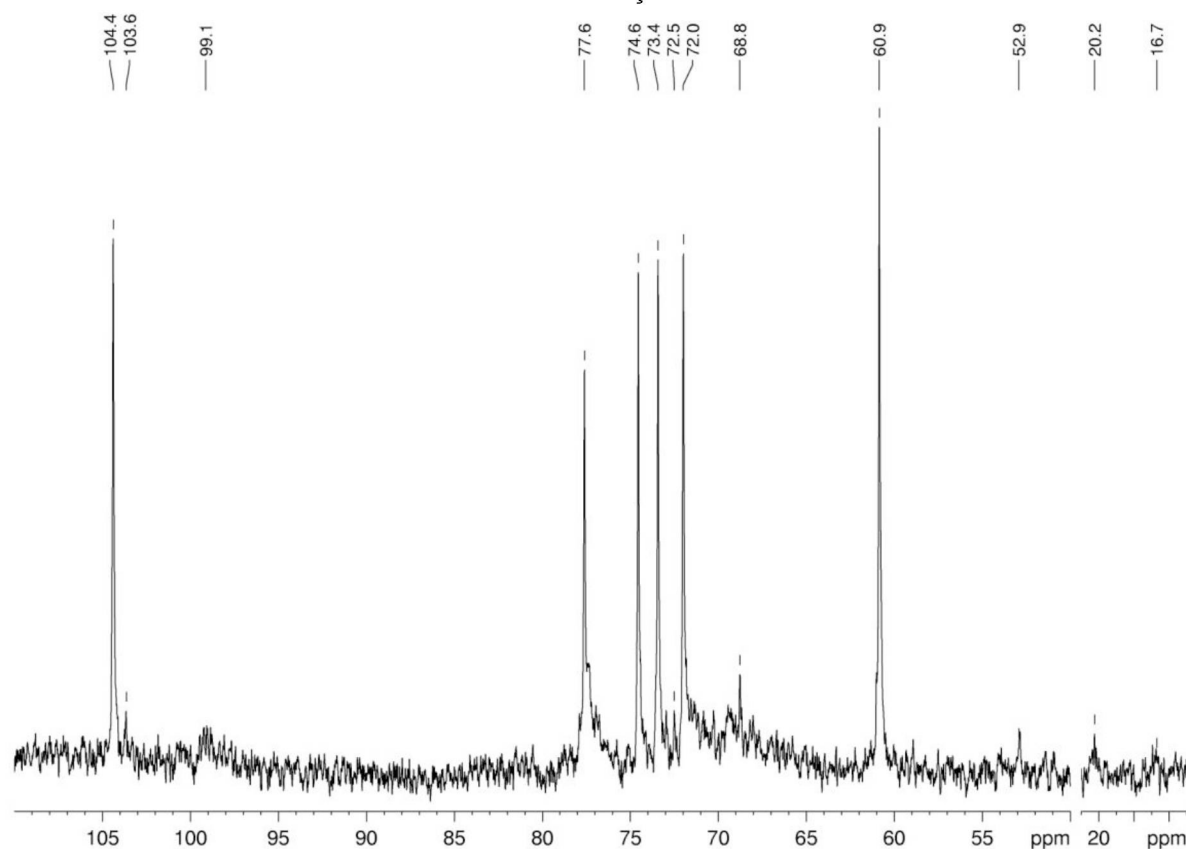


FONTE: O autor (2016).

2.4.6 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E METILAÇÃO

O espectro de RMN de ^{13}C da fração F2 é apresentado na Figura 2.18. No espectro é possível visualizar seis sinais principais, as quais foram atribuídas às unidades de $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)}$ -ligadas em 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. Outros sinais de baixa intensidade e alguns deles de baixa intensidade e resolução também podem ser observados, como o conjunto de sinais entre aproximadamente 100-98,5 ppm atribuídos ao C-1 das unidades de $\alpha\text{-D-GalpA}$ esterificadas e não esterificadas (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO et al., 2006; VRIESMANN, 2008; CIPRIANI et al., 2004; RENARD et al., 1998). O sinal em 68,8 ppm corresponde ao C-6 de hexoses substituídas.

FIGURA 2.18 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F2



NOTA: Solvente: D_2O (50°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm).

FONTE: O autor (2016).

O espectro apresenta ainda, em campo mais alto, deslocamentos químicos em 16,7 e 20,2 ppm referentes ao $-\text{CH}_3$ das unidades de ramnose (C-6) e

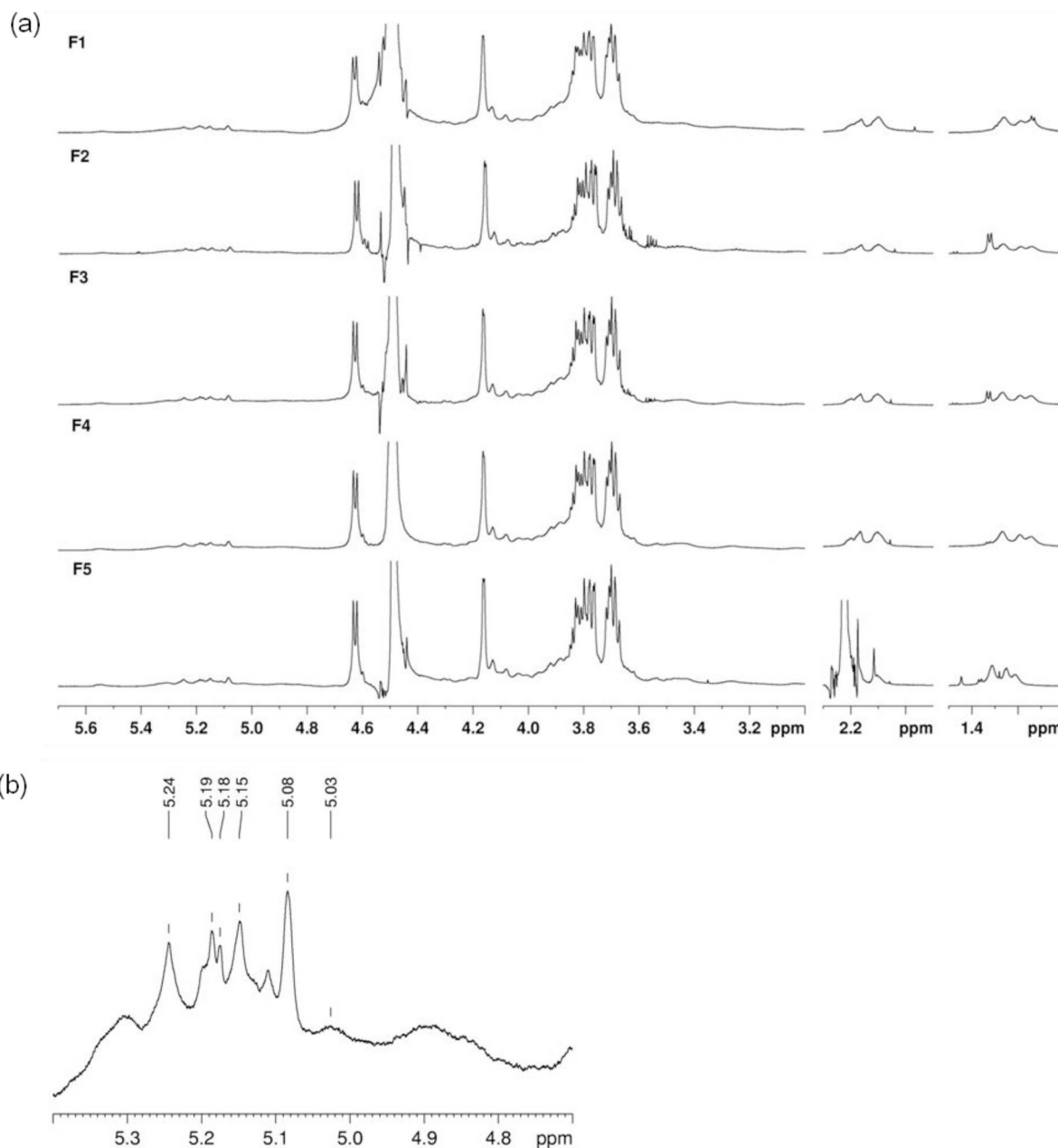
grupamento acetil, respectivamente (WANG; LIU; FANG, 2005; COZZOLINO et al., 2006). Os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos (ácidos urônicos esterificados) ressonaram em 52,9 ppm (COZZOLINO et al., 2006; VRIESMANN, 2008). Estes dados juntamente com os dados de composição monossacarídica corroboram a existência de fragmentos de pectina (ácido galacturônico e ramnose) com elevados teores de galactanas β -D-(1 \rightarrow 4)-ligadas nestas frações.

As subfrações F1-F5 foram também comparadas por RMN de ^1H (Figura 2.19). Essa análise comprova a semelhança quanto à composição monossacarídica evidenciada anteriormente (Tabela 2.5). De modo geral os mesmos sinais podem ser observados em todas as frações. Na região anomérica observa-se um sinal intenso em 4,62 ppm, com constante de acoplamento de 7,96 Hz, atribuído ao H-1 das unidades de β -D-Galp. Outro sinal intenso é observado em 4,16 ppm referente ao H-4 ligado dessas mesmas unidades.

É possível observar outros sinais na região anomérica de campo mais baixo, característicos de unidades em configuração α . Os sinais em 5,18; 5,15 e 5,08 ppm foram atribuídos ao H-1 de unidades terminais α -L-Araf (1 \rightarrow , unidades α -L-Araf (1 \rightarrow 2,5)-ligadas e α -L-Araf (1 \rightarrow 5)-ligadas, respectivamente (FRANSEN et al., 2000; POLLE et al., 2002; HABIBI et al., 2004; OVODOVA et al., 2009; CAPEK et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012; MARIA-FERREIRA et al., 2013; POPOV et al., 2014). Sinal em 5,24 e 5,03 ppm correspondem ao H1 de unidades de α -L-Rhap e α -D-GalAp (COLQUHOUN et al., 1990; WINN; MILLER; WILKINSON, 1995; POLLE et al., 2002; CARDOSO et al., 2007).

As frações apresentaram também deslocamentos químicos em 3,86 ppm atribuído ao metil-éster dos grupos carboxílicos; deslocamentos em campo alto em 2,10 e 2,16 ppm atribuídos aos grupos acetil das unidades de α -D-GalAp e 1,36; 1,33; 1,31 e 1,25 ppm correspondentes ao C-6 das unidades de α -L-Rhap (WINN; MILLER; WILKINSON, 1995; MARIA-FERREIRA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013).

FIGURA 2.19 - (a) RMN DE ^1H DAS SUBFRAÇÕES F1-F5; (b) AMPLIAÇÃO DE SINAIS DA REGIÃO α -ANOMÉRICA DA FRAÇÃO F4

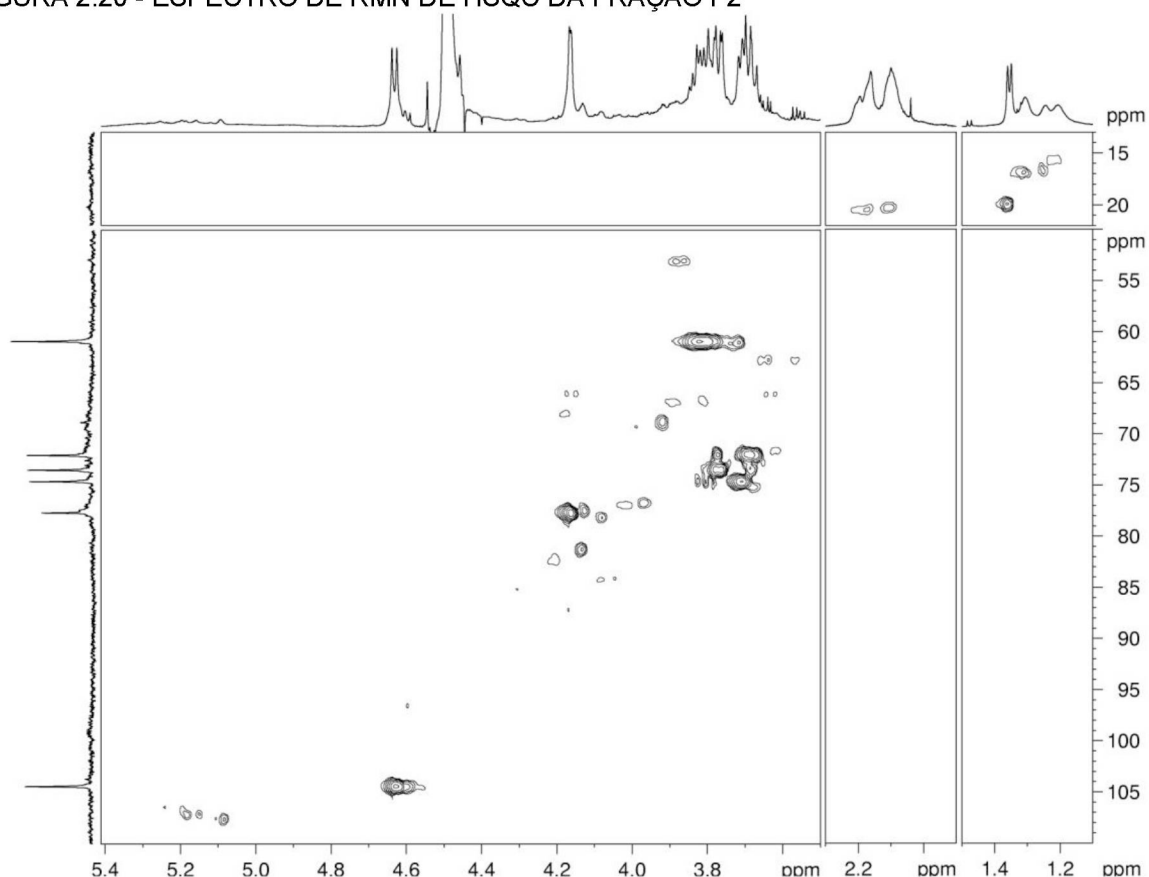


NOTA: Solvente: D_2O (50°C); acetona como padrão interno (2,224 ppm).

FONTE: O autor (2016).

A região dos hidrogênios do anel, entre 3,5 e 4,4 ppm, mostra vários outros sinais, no entanto não foram atribuídos a nenhuma das unidades em função da complexidade. Por essa razão, a fração FS-EpA foi submetida ao experimento de HSQC (Figura 2.20). Esta técnica heteronuclear, permite a partir do mapa de correlações, determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados aos respectivos átomos de carbono (^{13}C) e contribuir no assinalamento dos espectros 1D de ^1H e ^{13}C .

FIGURA 2.20 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO F2



NOTA: Solvente: D₂O (50°C); acetona como padrão interno (30,2 e 2,224 ppm).
 FONTE: O autor (2016).

Na região anomérica, observa-se correlações em 104,4/4,62 e 96,5/4,59 ppm, correspondentes ao C1/H1 de unidades de galactose β -(1 \rightarrow 4)-ligadas e terminais redutores de galactose, anômero β (COLQUHOUN et al., 1990; FRANSEN et al., 2000; POLLE et al., 2002; CIPRIANI et al., 2004; HABIBI; MAHROUZ; VIGNON, 2005; CIPRIANI et al., 2009; OVODOVA et al., 2009; CAPEK et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012; POPOV et al., 2014). Na mesma região visualizam-se também sinais em 107,1/5,18; 107,6/5,08, 107,6/5,10 e 107,1/5,14 atribuídos aos terminais não redutores de α -L-Araf, as unidades de α -L-Araf (1 \rightarrow 5)-ligadas e às unidades de α -L-Araf O-3 e O-2 substituídas (FRANSEN et al., 2000; POLLE et al., 2002; HABIBI et al., 2004; OVODOVA et al., 2009; CAPEK et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012; MARIA-FERREIRA et al., 2013; POPOV et al., 2014). Deslocamentos químicos detectados em campo alto: 16,8/1,31; 16,7/1,25 e 16,6/1,33 ppm correspondem ao CH₃ de unidades ramnosil (COLQUHOUN et al., 1990; WINN; MILLER; WILKINSON, 1995; POLLE et al., 2002; CARDOSO et al., 2007). Correlações em 20,4/2,17 e 20,2/2,10 ppm foram atribuídos a grupos acetil

localizados em C-2 e C-3 de unidades α -D-GalpA (NASCIMENTO et al., 2013). As demais correlações para cada uma dessas unidades estão dispostas na Tabela 2.6, bem como outros assinalamentos de carbonos e hidrogênios presentes na fração FS-EpA.

TABELA 2.6 - ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA FRAÇÃO FS-EpA

Unidade	Deslocamentos Químicos (ppm)					
	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5;H5'	C6/H6;H6'
α -L-Araf-(1 \rightarrow	107,1/5,18	-	76,5/3,96	84,2/4,08	62,5/3,81	-
\rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow	107,6/5,08	81,0/4,13	76,9/4,01	82,0/4,20	66,7/3,88;3,80	-
\rightarrow 2,5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow	107,1/5,14	87,0/4,16	76,4/4,08	82,4/4,21	66,4/3,93;3,85	-
\rightarrow 3,5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow	107,6/5,10	79,3/4,28	84,0/4,04	81,2/4,31	66,4/3,93;3,83	-
β -D-Galp-(1 \rightarrow	104,4/4,59	71,7/3,63	73,6/3,68	68,7/3,91	75,1/3,67	60,9/3,73
4 \rightarrow)- β -D-Galp	96,5/4,59	72,4 /3,56	71,9/3,77	77,4/4,12	-	-
\rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	104,4/4,62	72,0/3,68	73,4/3,78	77,6/4,16	74,6/3,71	60,8/3,8;3,71
\rightarrow 4,6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	104,4/4,55	72,0/3,77	71,9/3,66	77,9/4,07	74,6/3,82	69,3/4,03;3,87
α -L-Rhap	nd/5,24	-	-	-	-	16,8/1,31; 16,7/1,25; 16,6/1,33
α -D-GalpA	99,0/5,03	-	-	-	-	-

NOTA: Grupos Acetil: 20,4/2,17; 20,2/2,10; Grupos OMe: 52,8/3,86; nd: não detectado.

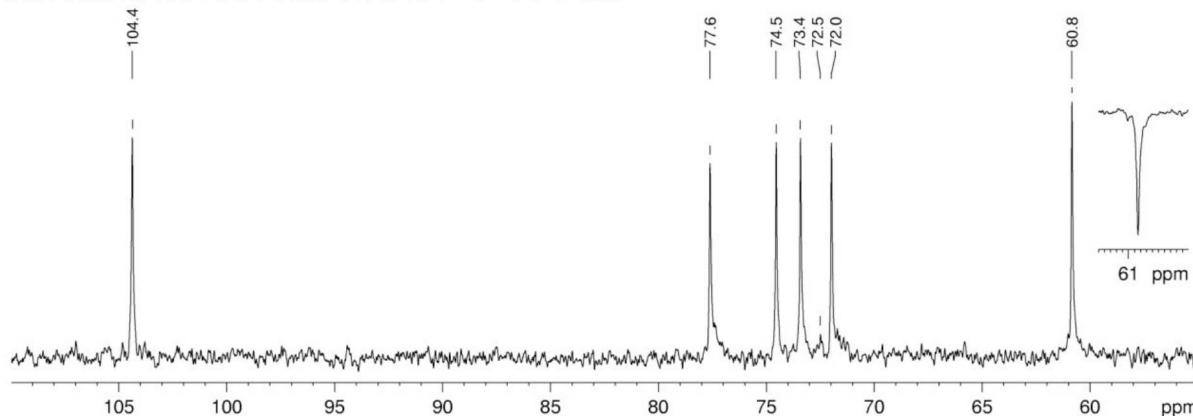
FONTE: O autor (2016).

A partir dos dados obtidos não foi possível, com os experimentos empregados nesse estudo, elucidar a estrutura química fina das subfrações isoladas de FS-EpA. No entanto, o presente trabalho esboçou características gerais dos polímeros obtidos, além de permitir a obtenção de três frações homogêneas. Outras técnicas de ressonância magnética nuclear juntamente com carboxiredução e análise de metilação devem ser utilizadas.

Assim como foi apresentado para as subfrações de FS-EpA, a fração homogênea FS-EpB também foi analisada por ressonância magnética nuclear, objetivando a elucidação da estrutura química do polissacarídeo. Na análise de RMN de ^{13}C dessa fração (Figura 2.21) foram verificados seis sinais principais na região de carboidratos (entre 60 e 110 ppm), referentes aos seis carbonos do anel de galactose (componente majoritário desta fração: 73,4%). São eles: 104,4 ppm referente ao carbono anomérico (C-1) em anomericidade β ; em 72,0 e 73,4 os sinais referentes ao C-2 e C-3; em 77,6 o sinal correspondente ao C-4 ligado; em 74,5 e 60,8 ppm sinais referentes aos C-5 e C-6 livre, respectivamente (GORIN;

MAZUREK, 1975; FRANSEN et al., 2000; CIPRIANI et al., 2004; LIMA, 2008; CIPRIANI et al., 2009). Esses sinais indicam a presença de β -galactanas (1 \rightarrow 4)-ligadas.

FIGURA 2.21 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO FS-EpB. NO DETALHE: SINAL INVERTIDO NO EXPERIMENTO DE ^{13}C -DEPT-135



NOTA: Solvente: D_2O (50°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm).

FONTE: O autor (2016).

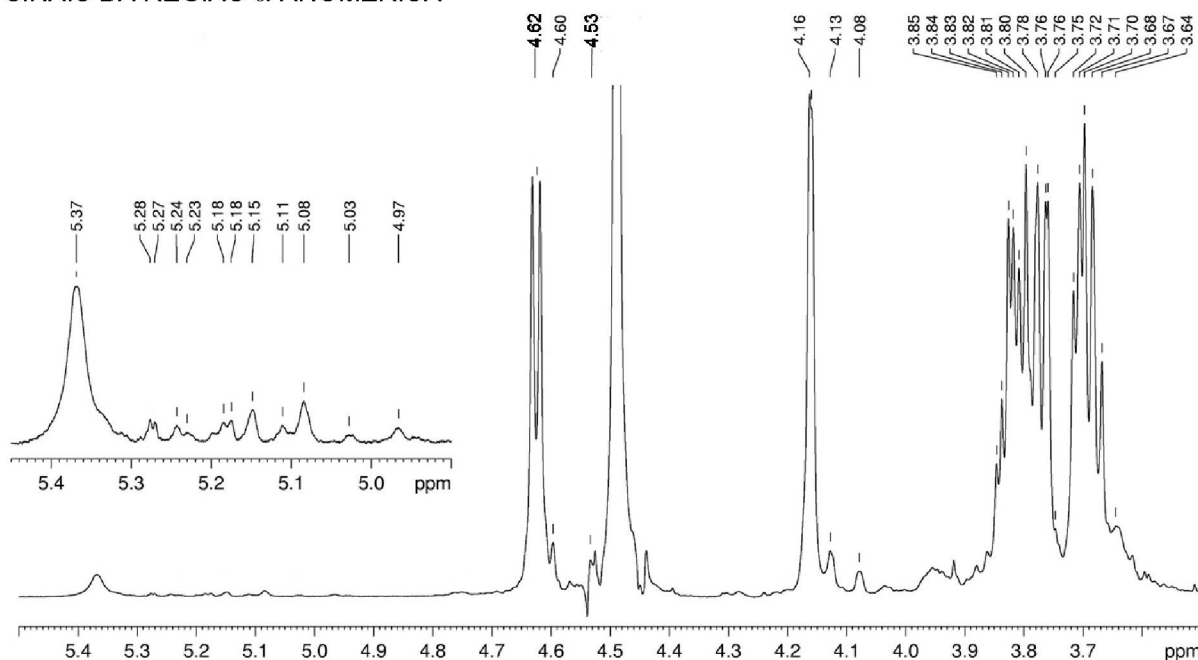
Essa fração foi então submetida à análise de RMN de ^{13}C DEPT-135, uma técnica que permite a inversão dos sinais de carbonos do tipo CH_2 . Tratando-se de polissacarídeos, os carbonos susceptíveis à inversão são os C-5 e C-6 de pentoses hexoses, respectivamente. No detalhe da Figura 2.21 é possível observar que apenas o sinal em 60,8 ppm inverteu. Esse sinal corresponde ao C-6 livre, não substituído, das unidades de β -D-Galp.

A fração FS-EpB também foi analisada por RMN de ^1H (Figura 2.22). Essa análise evidêcia um sinal na região anomérica em 4,62 ppm atribuído ao H-1 das unidades de β -D-Galp. O valor de 7,91 Hz para a constante de acoplamento deste sinal confirma a anomericidade β dessas unidades. Observa-se também outro sinal intenso em 4,16 ppm referente ao H-4 ligado a carbono substituído (C-4) dessas mesmas unidades.

Os sinais em 5,37; 5,33 e 4,97 ppm foram atribuídos a unidades de α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-ligadas, terminais não redutores e unidades α -D-Glcp (1 \rightarrow 4,6)-ligadas, respectivamente (GIDLEY, 1985; TELEMAN et al., 1999; RICHARDSON et al., 2000; CHENG; NEISS, 2012; JORDAN et al., 2014; DEPAOLI-ROACH et al., 2015; KUZ'MINA et al., 2015). A identificação de todos esses sinais indica presença de amido nessa fração. Integrando a área correspondente ao sinal do H-1 das unidades β -D-Galp (4,62 ppm) e α -D-Glcp (5,37 ppm) é possível

determinar uma razão Gal:Glc de 10:1, corroborando com os dados de composição monossacarídica para esta fração.

FIGURA 2.22 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FS-EpB. NO DETALHE: AMPLIAÇÃO DE SINAIS DA REGIÃO α -ANOMÉRICA



NOTA: Solvente: D_2O (50°C); acetona como padrão interno (2,224 ppm).

FONTE: O autor (2016).

Na mesma região α -anomérica, é possível visualizar também sinais em 5,18; 5,15 e 5,08 ppm característicos de H-1 de unidades terminais não redutoras de α -L-Araf-(1 \rightarrow), unidades α -L-Araf (1 \rightarrow 5)-ligadas substituídas em O-2 e α -L-Araf (1 \rightarrow 5)-ligadas, respectivamente (FRANSEN et al., 2000; POLLE et al., 2002; HABIBI et al., 2004; OVODOVA et al., 2009; CAPEK et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012; MARIA-FERREIRA et al., 2013; POPOV et al., 2014). Outros sinais podem ser visualizados na região dos hidrogênios do anel, entre 3,5 e 4,4 ppm, que pela sua intensidade podem ser atribuídos aos outros hidrogênios das unidades de β -D-Galp, α -D-Glcp (H-2, H-3, H-4, H-5 e H6) e α -L-Araf (H-2, H-3, H-4 e H-5), no entanto, não foi possível fazer uma atribuição específica para cada sinal em função da complexidade dos mesmos.

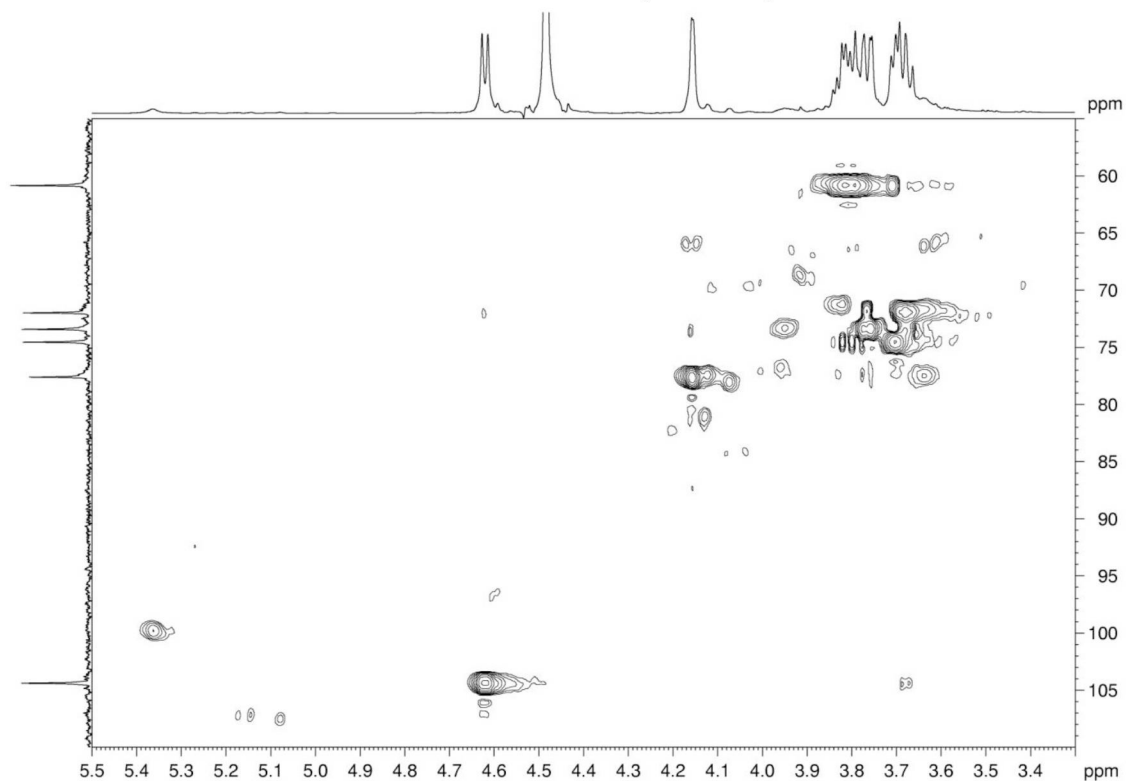
Para elucidação da estrutura química fina, a fração FS-EpB foi então submetida ao experimento de HSQC (Figura 2.23), assim como apresentado para a fração anterior, e adicionalmente aos experimentos de COSY (Figura 2.24) e TOCSY (Figura 2.25) (técnicas homonucleares utilizadas para correlacionar os

deslocamentos químicos dos núcleos de prótons vicinais (COSY) e demais núcleos do sistema spin acoplado (TOCSY).

É possível observar, na região de carbonos anoméricos do espectro de HSQC a correlação em 104,4/4,62 ppm correspondente ao C1/H1 de unidades de galactose β -(1 \rightarrow 4)-ligadas, além de outras quatro correlações em 104,3/4,59; 104,4/4,55; 96,5/4,60 e 92,4/5,27 ppm referente aos C1/H1 de unidades de terminais não redutores de galactose; unidades de galactose O-4-ligadas e O-6-substituídas, e terminais redutores de galactose na forma β e α (GORIN; MAZUREK, 1975; COLQUHOUN et al., 1990; DELGOBO et al., 1999; FRANSEN et al., 2000; POLLE et al., 2002; HABIBI; MAHROUZ; VIGNON, 2005; OVODOVA et al., 2009; WEFERS; TYL; BUNZEL, 2014). Correlação em 69,6/4,03 ppm, referente ao C6/H6 confirma a presença de unidades de galactose substituídas. As demais correlações referentes aos C/H do anel foram assinaladas conforme literatura e estão descritas na Tabela 2.7.

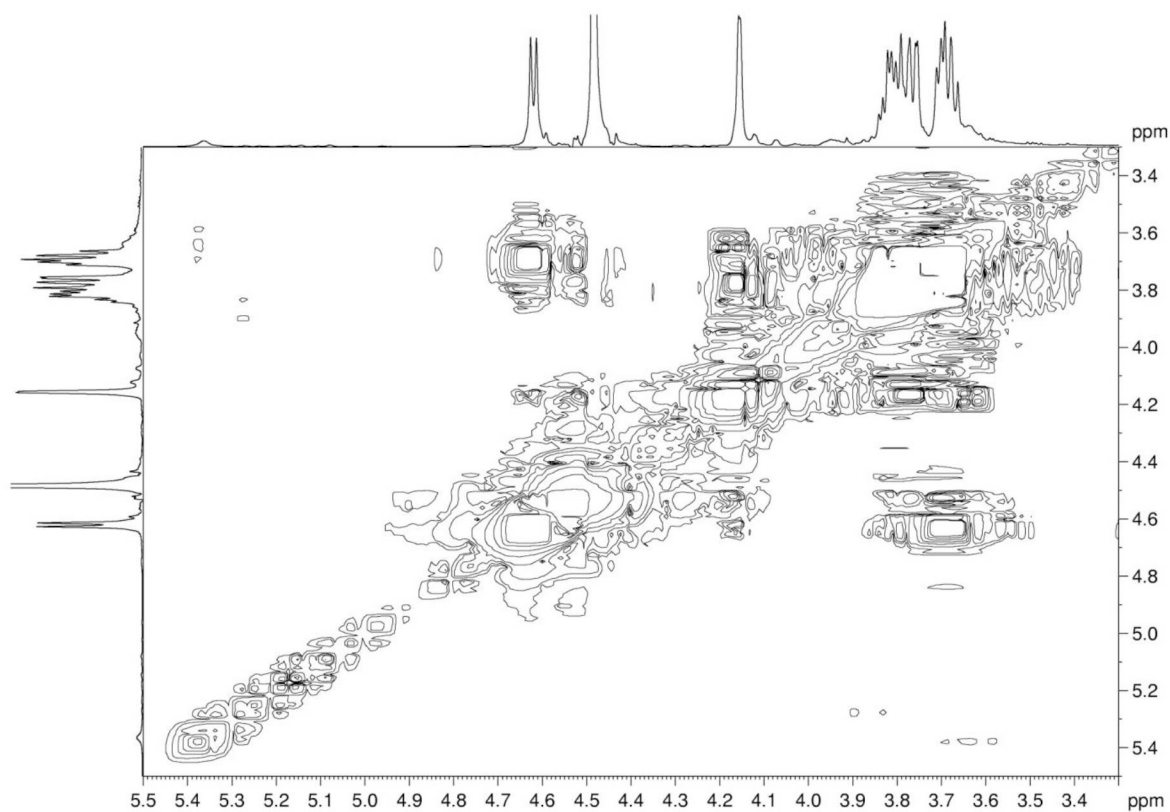
Na região anomérica existe também um grupo de sinais, em região de campo mais baixo, que tipicamente caracterizam as unidades de α -L-Araf. As correlações de C1/H1 em 107,6/5,08; 107,2/5,18 e 107,1/5,14 ppm foram atribuídas as unidades de (\rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow), aos terminais não redutores de α -L-Araf e às unidades de (\rightarrow 2,5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow)-ligadas, respectivamente (FRANSEN et al., 2000; POLLE et al., 2002; HABIBI et al., 2004; OVODOVA et al., 2009; CAPEK et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012; MARIA-FERREIRA et al., 2013; POPOV et al., 2014). Observam-se também correlações (C-5/H-5;H-5') características de ligações α -L-(1 \rightarrow 5) de Araf em 66,9/3,89;3,80 e 66,4/3,93;3,80 ppm. As correlações em 87,4/4,15 e 84,1/4,04 ppm foram atribuídas as correlações C-2/H-2 e C-3/H-3 das unidades de α -L-Araf O-5 ligadas substituídas em O-2 e O-3, respectivamente.

FIGURA 2.23 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO FS-EpB



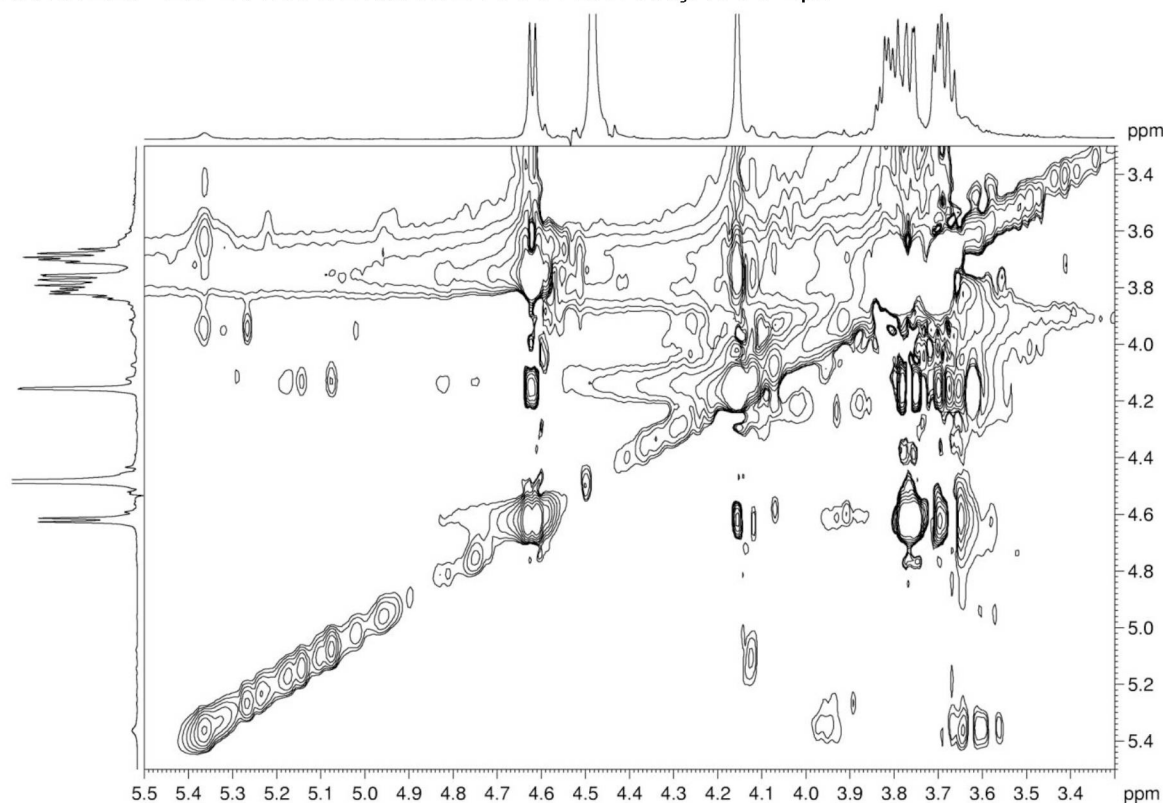
NOTA: Solvente: D₂O (50°C); acetona como padrão interno (30,2 e 2,224 ppm).
FONTE: O autor (2016).

FIGURA 2.24 - ESPECTRO DE RMN DE COSY DA FRAÇÃO FS-EpB



NOTA: Solvente: D₂O (50°C); acetona como padrão interno (2,224 ppm).
FONTE: O autor (2016).

FIGURA 2.25 - ESPECTRO DE RMN DE TOCSY DA FRAÇÃO FS-EpB



NOTA: Solvente: D₂O (50°C); acetona como padrão interno (2,224 ppm).

FONTE: O autor (2016).

Observam-se ainda as correlações 99,8/5,37; 71,8/3,6; 73,2/3,96; 77,5/3,64; 71,2/3,83 e 63,9/3,81; 3,79 ppm atribuídas respectivamente ao C1/H1, C2/H2, C3/H3, C4/H4, C5/H5 e C6/H6;H-6' livre das unidades de α -D-Glcp (1 \rightarrow 4)-ligadas derivadas de cadeias de amilopectina (TELEMAN et al., 1999; CHENG; NEISS, 2012; JORDAN et al., 2014). A correlação em 99,8/5,33 ppm corresponde aos terminais não redutores de unidades D-Glcp (CHENG; NEISS, 2012; JORDAN et al., 2014; KUZ'MINA et al., 2015).

Todos os assinalamentos de carbonos e hidrogênios presentes na fração FS-EpB estão dispostos na Tabela 2.7.

Para confirmação da posição das ligações glicosídicas, a fração FS-EpB foi submetida à análise de metilação (Tabela 2.8). As unidades de galactose apresentaram-se majoritariamente na forma do derivado 2,3,6-Me₃Gal (90,43%), correspondente às unidades de galactose (1 \rightarrow 4)-ligadas. A presença de pequena quantidade de unidades Galp 4,6-di-O-substituída (1,04%) evidencia um baixo grau de ramificação, com razão entre as unidades não substituídas e substituídas de

1:0,01, indicando que há aproximadamente uma ramificação a cada 100 unidades da cadeia principal.

TABELA 2.7 - ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA FRAÇÃO FS-EpB

Unidade	Deslocamentos Químicos (ppm)					
	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5;H5'	C6/H6;H6'
α -L-Araf-(1→	107,2/5,18	81,2/4,13	76,6/3,96	84,1/4,08	62,5/3,81	-
→5)- α -L-Araf-(1→	107,6/5,08	81,1/4,13	77,0/4,00	82,3/4,20	66,9/3,89;3,80	-
→2,5)- α -L-Araf-(1→	107,1/5,14	87,4/4,15	76,9/4,04	nd	66,4/3,93;3,80	-
→3,5)- α -L-Araf-(1→	107,4/5,10	79,3/4,28	84,1/4,04	81,8/4,27	66,4/3,91;3,78	-
β -D-Galp-(1→	104,3/4,59	71,7/3,59	73,3/3,68	68,8/3,91	74,9/3,66	-
4→)- α -D-Galp	92,4/5,27	69,0/3,89	nd/3,94	78,2/4,22	69,7/4,11	-
4→)- β -D-Galp	96,5/4,60	nd/3,58	71,9/3,76	77,4/4,12	74,5/3,80	-
→4)- β -D-Galp-(1→	104,4/4,62	71,9/3,68	73,3/3,78	77,7/4,16	74,5/3,71	60,8/3,8;3,71
→4,6)- β -D-Galp-(1→	104,4/4,55	71,7/3,64	71,9/3,76	78,1/4,07	74,6/382	69,6/4,03
α -D-Glcp-(1→	99,8/5,33	72,2/3,56	nd/3,40	-	-	-
→4)- α -D-Glcp-(1→	99,8/5,37	71,8/3,6	73,2/3,96	77,5/3,64	71,2/3,83	63,8/3,81;3,79
→4,6)- α -D-Glcp-(1→	nd/4,97	nd/3,56	-	nd/3,6	-	-

NOTA: nd: não determinado.

FONTE: O autor (2016).

TABELA 2.8 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DO POLISSACARÍDEO FS-EpB

Alditóis acetatos parcialmente metilados ^a	Tipo de Ligação correspondente	Tempo de Retenção ^b	Mol% ^c	Proporção
2,3,5-Me ₃ Ara	α -L-Araf-(1→	6,595	1,37	0,01
2,3-Me ₂ Ara	→5)- α -L-Araf-(1→	8,401	2,98	0,03
2,3,4,6-Me ₄ Gal	β -D-Galp-(1→	8,578	2,69	0,02
2-MeAra	→2,5)- α -L-Araf-(1→	9,869	1,5	0,03
2,3,6-Me ₃ Gal	→4)- β -D-Galp-(1→	10,851	90,43	1
2,3-Me ₂ Gal	→4,6)- β -D-Galp-(1→	15,943	1,04	0,01

NOTA: ^a Metilação realizada segundo CIUCANU; KEREK (1984); ^b Tempo de retenção (min) dos derivados em coluna DB-225; ^c Percentual relativo dos derivados metilados nos polissacarídeos.

FONTE: O autor (2016).

Além disso observa-se a presença de terminais não redutores de Araf (1,37%) e Galp (2,69%) e unidades de Araf 5-O- (1,5%) e 2,5-di-O- substituídas (2,98%), corroborando com os resultados de RMN apresentados anteriormente. O teor subestimado de terminais não redutores de Araf é decorrente da alta volatibilidade dessas unidades, sendo perdidas nas etapas de evaporação durante o processo de preparação de alditóis acetatos.

Esses resultados permitem concluir que o polissacarídeo consiste de uma galactana com cadeia principal (1→4)-ligada. Esse polissacarídeo não ocorre de maneira nativa, o tratamento termoquímico utilizado durante o processo de extração do farelo de soja permitiu uma despolimerização da pectina extraída, gerando a produção de uma β -galactana neutra. Comumente na literatura são reportadas extrações de farelo de soja que resultam em cadeias de arabinogalactanas com razões médias entre Gal:Ara de 2~3:1 (MORITA, 1965; BRILLOUET; CARRÉ, 1983; CIPRIANI et al., 2009; TSUBAKI et al., 2009) resultados diferentes aos encontrados nesse trabalho, onde obteve-se uma razão Gal:Ara de 10:1.

Com base nos resultados apresentados é possível afirmar que a cromatografia de exclusão em Sepharose 6B foi eficiente na separação de subfrações constituídas por um grupo de moléculas de alta massa molar, caracterizadas como pectinas parcialmente despolimerizadas (FS-EpA) e uma subfração que apresenta uma β -D-galactana de baixa massa molar (FS-EpB).

2.5 CONCLUSÕES

O processo de extração (tratamento químico do farelo de soja) utilizado permitiu a obtenção de uma fração bruta (FS-Ep) que apresenta alto teor de carboidratos (85,0%) e baixo teor de proteínas (4,7%). As demais frações obtidas (FS-R, FS-Tp, FS-A e FS-Es) apresentaram elevados teores de proteínas e baixos teores de carboidratos. Todas as frações apresentaram galactose, arabinose e ácido urônico como monossacarídeos principais.

O fracionamento de FS-Ep, por cromatografia de exclusão, utilizando Sepharose 6B como fase estacionária e água destilada/NaCl 1M como fase móvel foi efetivo para purificação de dois grupos de moléculas (FS-EpA e FS-EpB). O primeiro grupo de moléculas, FS-EpA, apresenta alta massa molar ($M_w \cong 500$ kDa), sendo composto por ácido galacturônico, galactose, arabinose, xilose e ramnose. Análises de ressonância magnética nuclear evidenciam a presença de polissacarídeos do tipo pectina, com unidades de α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-ligadas e cadeias laterais de α -L-Araf-(1 \rightarrow 5)-ligadas e β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-ligadas. A outra fração obtida, FS-EpB é composta majoritariamente por uma β -D-Galactana-(1 \rightarrow 4)-ligada de baixa massa molar ($M_w \cong 9$ kDa). Esses polissacarídeos não ocorrem naturalmente, são resultados de uma despolimerização da pectina extraída pelo tratamento termoquímico utilizado durante o processo de extração do farelo de soja, gerando a produção de uma β -galactana neutra e uma pectina parcialmente despolimerizada.

REFERÊNCIAS

- ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. **Estatística mensal do complexo soja**. 2015a. Disponível em: < <http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=> >. Acesso em: 12/08/2015.
- _____. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. **Exportações do complexo soja**. 2015b. Disponível em: < http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/11082015-104929-exp_201507.pdf >. Acesso em: 12/08/2015.
- APROSOJA. Associação dos Produtores de Soja do Estado do Mato Grosso. **Preço farelo de soja. 2015**. Disponível em: < <http://www.aprosoja.com.br/soja-e-milho/historico-cotacao/preco-farelo-de-soja> >. Acesso em: 20/11/2015.
- ASPINALL, G. O. Chemistry of soybean carbohydrates. In: Soybean utilization alternatives: A symposium sponsored by The Center for Alternative Crops and Products, St. Paul. **Anais...** St. Paul: The Center for Alternate Crops and Products, 1988. p. 117-129.
- ASPINALL, G. O.; BEGBIE, G. et al. Polysaccharides of soybeans. Part III. Extraction and fractionation of polysaccharides from cotyledon meal. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, v. 5, p. 1065-1070, 1967.
- ASPINALL, G. O.; COTTRELL, I. W. et al. Polysaccharides of soybeans. IV. Partial hydrolysis of the acidic polysaccharide complex from cotyledon meal. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**, v. 11, p. 1071-1080, 1967.
- ASPINALL, G. O.; COTTRELL, I. W. Polysaccharides of soybeans. VI. Neutral polysaccharides from cotyledon meal. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1019-1022, 1971.
- ASPINALL, G. O.; HUNT, K.; MORRISON, I. M. Polysaccharides of soybeans. Part II. Fractionation of hull cell-wall polysaccharides and the structure of a xylan. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, p. 1945-1949, 1966.
- BAINY, E. M. et al. Varietal differences of carbohydrates in defatted soybean flour and soy protein isolate by-products. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 4, p. 664-672, 2008.
- BECKER, P. M.; GALLETTI, S. Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 11, p. 2026-2035, 2008.
- BECKER, P. M. et al. Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2686-2696, 2007.
- BERHOW, M. A. et al. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutation Research**, v. 448, n. 1, p. 11-22, 2000.

BRILLOUET, J.M.; CARRÉ, B. Composition of cell walls from cotyledons of *Pisum sativum*, *Vicia faba* and *Glycine max*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 841-847, 1983.

CAPEK, P. et al. Structural features of an arabinogalactan-protein isolated from instant coffee powder of *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 180-185, 2010.

CARDOSO, S. M. et al. Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell walls. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7124-7130, 2007.

CARPITA, N. C. S., ELAINE M. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMAN, C. J.; MCGINNIS, G. D. (Ed.). **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. cap. 9, p. 157-216.

CARPITA, N. C., SHEA, E. M. Linkage structure of carbohydrates by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. (Ed.), **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Boston: CRC Press, 1988. p. 157-216.

CARUSO, R. **Soja - Um caminho sem fim**. Campinas: Fundação Cargill, 1997.

CHANG, J. H. et al. Effects of soybean supplementation on blood glucose, plasma lipid levels, and erythrocyte antioxidant enzyme activity in type 2 diabetes mellitus patients. **Nutrition Research and Practice**, v. 2, n. 3, p. 152-157, 2008.

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, n. 4, p. 1633-1636, 2010a.

_____. Chemical composition analysis of soybean oligosaccharides and its effect on ATPase activities in hyperlipidemic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 229-231, 2010b.

CHENG, H. N.; NEISS, T. G. Solution NMR spectroscopy of food polysaccharides. **Polymer Reviews**, v. 52, n. 2, p. 81-114, 2012.

CHIVERO, P. et al. Physical properties of oil-in-water emulsions as a function of oil and soy soluble polysaccharide types. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 34-40, 2014.

CIPRIANI, T. R. et al. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 687-690, 2009.

_____. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 703-706, 2004.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.

CLERICI, C. et al. Novel soy germ pasta improves endothelial function, blood pressure, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 9, p. 1946-1948, 2011.

COLQUHOUN, I. J. et al. Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase. **Carbohydrate Research**, v. 206, n. 1, p. 131-144, 1990.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2015.

CORDEIRO, L. M. C. et al. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: structure and gastroprotective activity. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 937-944, 2012.

COZZOLINO, R. et al. Structural analysis of the polysaccharides from *Echinacea angustifolia* radix. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 3, p. 263-272, 2006.

CROMWELL, G. L. **Soybean Meal – An exceptional protein source**. Ankeny, 2012. Disponível em: < <http://www.soymeal.org/ReviewPapers/SBMExceptionalProteinSource.pdf> >. Acesso em: 20/11/2015.

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, n. 3-4, p. 167-175, 1999.

DEPAOLI-ROACH, A. A. et al. Glycogen phosphomonoester distribution in mouse models of the progressive myoclonic epilepsy, Lafora disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 2, p. 841-850, 2015.

DESAI, B. B. **Handbook of Nutrition and Diet**. New York: Marcel Dekker, 2000. 816.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - Paraná 2005**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 224.

EMPRAPA. **Soja na alimentação**. 2015. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/soja-na-alimentacao> >. Acesso em: 15/11/2015.

FASOLIN, L. H. A. C. R. L. Characterisation of soy extract processed under different drying methods and extraction conditions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 3, p. 503-511, 2013.

FILISSETTI-COZZI, T. M.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157-162, 1991.

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, n. 4, p. 539-547, 2000.

FUKUDA, M. et al. Effects of feeding with okara on plasma and liver lipid levels in rats. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 53, n. 4, p. 195-199, 2007.

FURUTA, H. et al. **Production of water-soluble polysaccharide**. JP07188301, Jul. 25, 1995.

_____. **Production of water-soluble polysaccharide**. JP10036405, Feb. 2, 1996.

FURUTA, H.; TAKAHASHI, T.; TOBE, J.; KIWATA, R. et al.. Extraction of water-soluble soybean polysaccharides under acidic conditions. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 12, p. 2300-2305, 1998.

FURUTA, H.; TAKAHASHI, T.; TOBE, J.; MOMEN, R. **Water soluble soybean polysaccharide and its production and use thereof**. JPH11279203, Oct. 12, 1998.

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y.J.; 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. C59-C64, 2006.

GIDLEY, M. J. Quantification of the structural features of starch polysaccharides by N.M.R. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 139, p. 85-93, 1985.

GOLLNER, E. M.; BLASCHEK, W.; CLASSEN, B. Structural investigations on arabinogalactan-protein from wheat, isolated with Yariv reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3621-3626, 2010.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1212-1223, 1975.

GUO, M. **Functional Foods: Principles and Technology**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009. 358 p.

HABIBI, Y. et al. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p. 1119-1127, 2004.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Isolation and structural characterization of protopectin from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 205-213, 2005.

HERMANSEN, K. et al. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. **Diabetes Care**, v. 24, n. 2, p. 228-233, 2001.

HONIG, D. H.; RACKIS, J. J. Determination of the total pepsin-pancreatin indigestible content (dietary fiber) of soybean products, wheat bran, and corn bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1262-1266, 1979.

HSIAO, H. Y.; ANDERSON, D. M.; DALE, N. M. Levels of β -Mannan in Soybean Meal. **Poultry Science**, v. 85, n. 8, p. 1430-1432, 2006.

HUA, Y. et al. **Membrane method for preparing pectic substance soybean water-soluble polysaccharide in grades**. CN101880336, Nov. 10, 2010.

HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max*) meal. Isolation and characterisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, n. 1, 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, n. 2, p. 185-191, 2000.

JANSSON, P. E. et al. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chemical communications University of Stockholm**, v. 8, p. 1-75, 1976.

JATOBÁ, S. S. **Processo para a produção de extrato aquoso de soja**. PI9600244-1, Jan. 29 1996.

JIMENEZ-ESCRIG, A. et al. Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7495-7501, 2008.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A. et al. Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by in vitro gastrointestinal digestion: identification of active peptide from soybean lipoxygenase. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 4, p. 655-663, 2010.

JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans. Chemistry, Production, Processing and Utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008.

JORDAN, T. et al. Molten imidazole - a starch solvent. **Green Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 1967-1973, 2014.

KAWAMURA, S. I.; NARASAKI, T. Studies on the carbohydrates of soybeans. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 527-531, 1961.

KEALLEY, C. S. et al. Structure and molecular mobility of soy glycinin in the solid state. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2937-2946, 2008.

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

_____. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 311-315, 2002.

KOGA, T.; KIKUCHI, M. Isolation and characterization of a novel immunomodulating fraction from soybeans. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 3, p. 367-371, 1993.

KUZ'MINA, N. E. et al. Modification of PMR spectroscopy technique for determination of the molar substitution in hydroxyethyl starch. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 49, n. 8, p. 559-563, 2015.

LABAVITCH, J. M.; FREEMAN, L. E.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. Purification and characterization of a beta-1,4-galactanase which degrades a structural component of the primary cell walls of dicots. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 19, p. 5904-5910, 1976.

LETTI, L. A. J. et al. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 44, p. 80-86, 2012.

LEUNG, M. Y. 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.

LI, J. et al. Characterization and functional properties of sub-fractions of soluble soybean polysaccharides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2568-2675, 2009.

LI, X. L. **Preparation method of soybean polysaccharide protein in soybean dregs**. CN101619095, Jan. 6, 2010.

LI, S. et al. Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. **ISRN Industrial Engineering**, v. 2013, Article ID 423590, 2013.

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, n. 4, p. 400-413, 2005.

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 U937 cells. **Anticancer Drugs**, v. 12, n. 10, p. 841-846, 2001.

LIMA, L. F. O. D. **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**. 195 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Departamento de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LIU, J.; WEN, X.; KAN, J. et al. Structural characterization of two water-soluble polysaccharides from black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 225-234, 2015.

LIU, J.; WEN, X.; ZHANG, X. et al. Extraction, characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from black soybean. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1182-1190, 2015.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. 532 p.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MA, F. Q. **Process for preparing water soluble soybean polysaccharide with bean pulp and bean dreg as raw materials**. CN1827651, Set. 6, 2006.

MA, L. et al. Selective chemical modification of soy protein for a tough and applicable plant protein-based material. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 26, p. 5241-5248, 2015.

MARIA-FERREIRA, D. et al. Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 125-133, 2013.

MATEOS-APARICIO, I. et al. Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 245-250, 2010.

MATSUMOTO, T.; MORIGUCHI, R.; YAMADA, H. Role of polymorphonuclear leucocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by HCl/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 535-539, 1993.

MDIC. **Exportação Brasileira - Grupos de produtos**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento, 2014.

MESSINA, M. Soybean isoflavones warrant greater consideration as a treatment for the alleviation of menopausal hot flashes. **Womens Health**, v. 10, n. 6, p. 549-553, 2014.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3 Suppl, p. 439s-450s, 1999.

MICHELFEELDER, A. J. Soy: a complete source of protein. **American Family Physician**, v. 79, n. 1, p. 43-47, 2009.

MITAMURA, R. et al. Ingestion of water-soluble soybean fiber prevents osteopenia and hypercholesterolemia induced by ovariectomy in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 1085-1089, 2003.

MIZUNO, A. et al. Relationship between the glass transition of soy protein and molecular structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3292-3297, 2000.

MORITA, M. Polysaccharides of soybean seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 564-573, 1965.

NAKAMURA, A. et al. Characterization and functional properties of soybean high-molecular-mass polysaccharide complex. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 75-84, 2012.

_____. Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 10, p. 2249-2258, 2001.

_____. Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 1155-1158, 2002a.

_____. Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 6, p. 1301-1313, 2002b.

NAKAO, Y.; MIYASHITA, K.; TODA, J. **Process for preparing soybean polysaccharides**. US4119435, Out. 10, 1978.

NANAE, F.; JUNKO, T.; AKIHIRO, N. **Novel water-soluble polysaccharides having high stability and method of producing the same**. WO2007139057, Dez. 6, 2007.

NASCIMENTO, A. M. et al. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

NEESER, J. R.; WURSCH, P. **Glycopeptide and oligosaccharide antibacterial compositions**. US4939123, Jul. 3, 1990.

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. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 2, p. 428-436, 1986.

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, n. 1-2, p. 255-269, 2005.

NOGUCHI, K.; SHIKANUMA, S. **Manufacture of polysaccharide containing uronic acid**. JP10036404, Fev. 10, 1996.

NOSEDA, M. D. et al. **Extrato de farelo de soja como inibidor bacteriano e processo para produção do mesmo**. BR1020120309106, Dez. 4, 2012.

O'TOOLE, D. K. Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production - a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 363-371, 1999.

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.

OLIVEIRA, M. R. R. D. **Avaliação por Rpe de componentes com potencial antioxidante de variedades de soja irradiadas com ⁶⁰CO**. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

OPELLA, S. J.; FREY, M. H.; CROSS, T. A. Detection of individual carbon resonances in solid proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 19, p. 5856-5857, 1979.

OVODOVA, R. G. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 610-615, 2009.

PICHAT, P. **A gestão de resíduos**. Lisboa: Instituto Piaget, 1995.

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.

POLLE, A. Y. et al. Structure of tanacetan, a pectic polysaccharide from tansy *Tanacetum vulgare* L. **Biochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1371-1376, 2002.

POPOV, S. V. et al. Pectic polysaccharides of the fresh plum *Prunus domestica* L. isolated with a simulated gastric fluid and their anti-inflammatory and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 143, p. 106-13, 2014.

QI, J. **Method for using membrane separation and classification to prepare soybean polysaccharides with different molecular weights**. CN101693746, Abr. 14, 2010.

RICHARDSON, S. et al. Characterisation of the substituent distribution in hydroxypropylated potato amylopectin starch. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 3, p. 365-373, 2000.

RODRIGUES, J. M. **Capacidade de ligação *in vitro* à bactérias enteropatogênicas dos extratos isolados de farelo de soja**. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ROSA, M. et al. Valorização de resíduos da agroindústria. In: Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais–II SIGERA, 2011, **Foz do Iguaçu. Palestra...**Foz do Iguaçu, 2011. v. 15.

SASSAKI, G. L. et al. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 731–739, 2005.

SEDAGHAT, A. et al. The effect of soy nuts on glycemic control, lipid profile and insulin-resistance in type 2 diabetic patients. **Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.

SHAHBAZIAN, H. et al. Beneficial effects of soy protein isoflavones on lipid and blood glucose concentrations in type 2 diabetic subjects. **Saudi Medical Journal**, v. 28, n. 4, p. 652-654, 2007.

SHIGA, K. et al. Ingestion of water-soluble soybean fiber prevents gastrectomy-induced iron malabsorption, anemia and impairment of voluntary running exercise performance in rats. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1120-1126, 2003.

_____. Ingestion of water-soluble soybean fiber improves gastrectomy-induced calcium malabsorption and osteopenia in rats. **Nutrition**, v. 18, n. 7-8, p. 636-642, 2002.

SIQUEIRA, P. F. et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156-8163, 2008.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. (Ed.). **Methods Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, v. 6, 1972. cap. 4, p. 20-24.

SOCCOL, C. R. et al. Biorefinery concept applied to valorization of agro-food coproducts and wastes. In: SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. (Ed.). **Fermentation processes engineering in the food industry**. New York: CRC Press, 2013. cap. 17, p. 429-464.

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

STAHL, E. **Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook**. Second. Berlin. Heidelberg. New York: Springer-Verlag, 1969.

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

TAKAHASHI, T. et al. Physiological effects of water-soluble soybean fiber in rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 8, p. 1340-1345, 1999.

TAKU, K. et al. Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Menopause**, v. 19, n. 7, p. 776-790, 2012.

TELEMAN, A. et al. Structure of dicarboxyl malto-oligomers isolated from hypochlorite-oxidised potato starch studied by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 315, n. 3-4, p. 286-292, 1999.

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. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 504-511, 1983.

TSUBAKI, S. et al. Microwave heating for solubilization of polysaccharide and polyphenol from soybean residue (okara). **Food Science and Technology Research**, v. 15, n. 3, p. 307-314, 2009.

TU, Z. et al. **Method of preparing soluble soybean polysaccharide**. CN101671400, Mar. 17, 2010.

USDA. **World agricultural production**. Department of Agriculture: Foreign Agricultural Service, 2015.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421-30, 2008.

VAZ JR, S. **Uso dos coprodutos e resíduos de biomassa para obtenção de produtos químicos renováveis**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2010.

VILLANUEVA, M. J. et al. Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 72-79, 2011.

VRIESMANN, L. C. **Extração, caracterização e aspectos reológicos de polissacarídeos da polpa dos frutos de *Theobroma grandiflorum* (CUPUAÇU)**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

WANG, X. S.; LIU, L.; FANG, J. N. Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 1, p. 95-101, 2005.

WARD, A. T.; REICHERT, R. D. Comparison of the effect of cell wall and hull fiber from canola and soybean on the bioavailability for rats of minerals, protein and lipid. **Journal of Nutrition**, v. 116, n. 2, p. 233-241, 1986.

WEFERS, D.; TYL, C. E.; BUNZEL, M. Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. **Frontiers in chemistry**, v. 2, article 100, 2014.

WHISTLER, R. L.; SAARNIO, J. Galactomannan from soybean hulls. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 22, p. 6055-6057, 1975.

WINN, A. M.; MILLER, A. W.; WILKINSON, S. G. Structure of the O10 antigen of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. **Carbohydrate Research**, v. 267, n. 1, p. 127-133, 1995.

WU, M.H. et al. Characterized polysaccharides from black soybean induce granulocyte colony-stimulated factor gene expression in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. **Immunological Investigations**, v. 40, n. 1, p. 39-61, 2011.

WU, Y.; WANG, T. Soybean lecithin fractionation and functionality. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 4, p. 319-326, 2003.

XIONG, X. et al. Effects of alkali treatment and subsequent acidic extraction on the properties of soybean soluble polysaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 239-247, 2015.

YAMADA, H. Structure and pharmacological activity of pectic polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum* L. **Nihon Yakurigaku Zasshi**, v. 106, n. 3, p. 229-237, 1995.

YAMAGUCHI, F. et al. **Production of water-soluble polysaccharide**. JP06256402, Set. 13, 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, n. 4, p. 265-273, 1996.

YAO, L.; ZHENYU, W.; HUA, Z. **One kind withdraws the soluble soybean polysaccharide from the big bean cake the method**. CN102232500, Set. 11, 2011.

YAO, X.-Q. et al. Inhibition on calcium oxalate crystallization and repair on injured renal epithelial cells of degraded soybean polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 392-398, 2012.

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. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 9, p. 1628-1635, 1999.

CAPÍTULO 3

CAPACIDADE DE ADESÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA À *Salmonella enterica* sv. Typhimurium

3.1 INTRODUÇÃO

Infecções entéricas são uma das causas globais de morbidade e mortalidade (WHO, 2014). *Salmonella* está entre os principais patógenos zoonóticos causadores de doenças entéricas (THORNS, 2000; NEWELL et al., 2010; BEHRAVESH; WILLIAMS; TAUXE, 2012). As espécies comumente reportadas em casos de salmonelose são *S. enterica* sv. Enteritidis e *S. enterica* sv. Typhimurium (GANNER et al., 2010; CRIM et al., 2014; EFSA/ECDC, 2015).

Antibióticos têm sido usados intensivamente para controle desses patógenos em animais (FDA, 2012; 2014). A reação por uso prolongado e excessivo desses produtos tem sido a resistência bacteriana (ZHAO et al., 2005; GULLBERG et al., 2011). Consequentemente, pesquisas com alternativas ao uso de antibióticos têm sido intensificadas (SHARON; OFEK, 2000; BIGGS, PARSONS; FAHEY, 2007). Alternativas naturais fazendo uso de pré-, pro- e simbióticos, vacinas antibacterianas, terapia fago, extratos de plantas, óleos essenciais, enzimas exógenas e ácidos orgânicos têm sido propostas (ALEKSHUN; LEVY, 2004; GUPTA et al., 2007; CALLAWAY et al., 2008; SANTOS et al., 2009; ADEOLA; COWIESON, 2011; PIRNAY et al., 2011).

Glicoconjugados, polissacarídeos e/ou oligossacarídeos, categorizados muitas vezes como prebióticos, podem atuar como receptores análogos, modulando a microbiota intestinal ao bloquear a adesão do patógeno ao tecido hospedeiro. A adesão à superfície do epitélio intestinal (colonização) é a primeira etapa crítica do processo de infecção (OFEK; MIRELMAN; SHARON, 1977; LINDHORST; KIEBURG; KRALLMANN-WENZEL, 1998; WILSON et al., 2002). Ela é mediada por fatores de aderência microbiana, chamados de adesinas, presentes na superfície do patógeno que se ligam a receptores complementares localizados na superfície do epitélio intestinal do hospedeiro. Impedindo a adesão, evita-se o processo de colonização do intestino.

Dessa forma, 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 et al., 2010).

Sacarídeos atuam como agentes anti-adesão ideais, uma vez que não são mutagênicos e bactericidas, evitando-se o risco de resistência e minimizando a pressão seletiva (SHARON; OFEK, 2000; THOMAS, 2010). No entanto, informações sobre sacarídeos e suas fontes de obtenção, acessibilidade, concentração e possíveis estruturas dos receptores para adesão bacteriana ainda não estão explícitas. A variação biológica de produtos naturais faz as predições, quanto ao potencial de adesão, ainda mais difíceis e abrangentes (GANNER et al., 2013). Mais estudos são necessários para elucidar tais informações (BECKER; GALLETTI, 2008).

Adicionalmente, existem algumas incertezas a respeito do uso desses receptores análogos quanto ao exato mecanismo de adesão de diversas cepas à superfície dos enterócitos (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010). Além disso, grande parte dos patógenos possui genes para 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 (OFEK; HASTY; SHARON, 2003; WITTSCHIER et al., 2007).

A adesão pode também envolver outros fatores além de adesinas-receptores, tais como interações hidrofóbicas ou outras interações não-específicas (OFEK; HASTY; SHARON, 2003). 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; THOMAS, 2010).

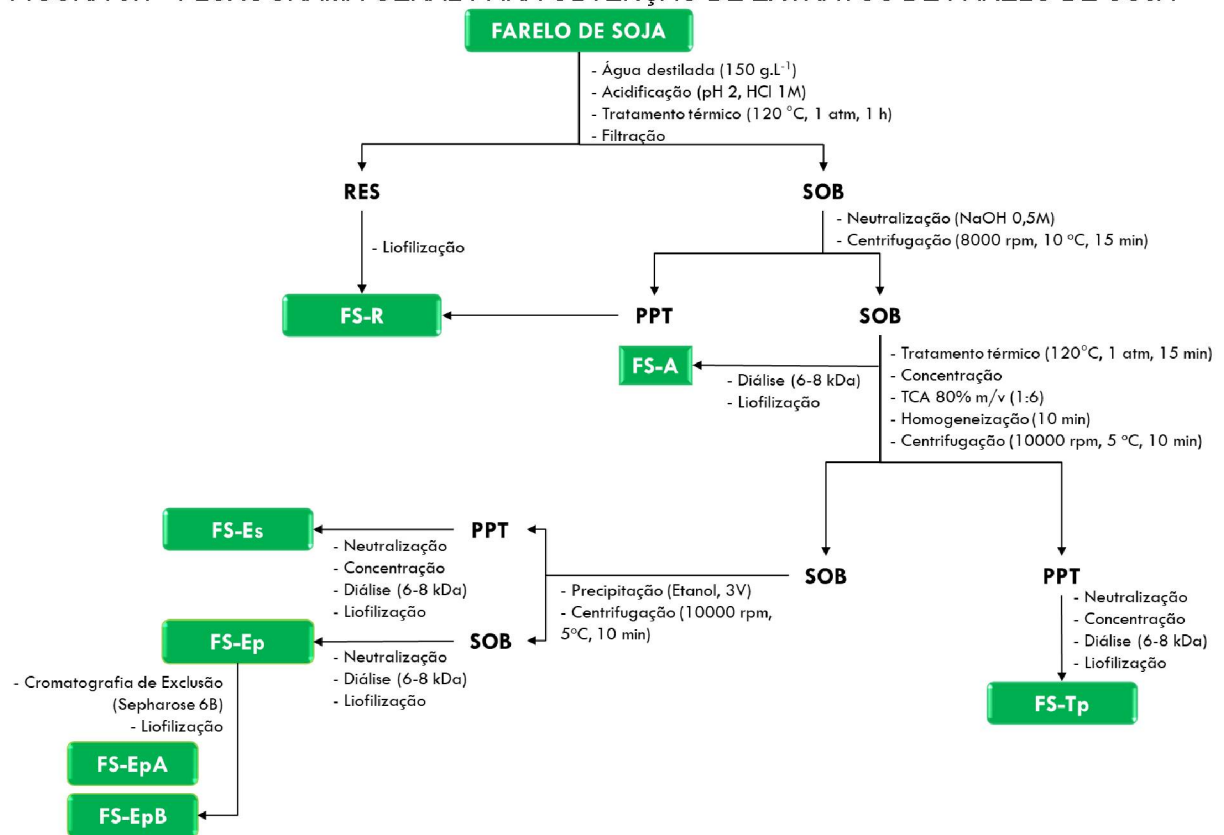
Os objetivos deste capítulo foram, portanto, avaliar a capacidade de adesão dos extratos e polissacarídeos purificados de farelo de soja, caracterizados no Capítulo 2, à *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, utilizando ensaios *in vitro*; e correlacionar a composição/estrutura dos extratos/frações com a capacidade de adesão a enterobactérias.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

A obtenção dos extratos de farelo de soja foi realizada conforme itens 2.3.2 e 2.3.3.5.1 apresentados detalhadamente no Capítulo 2. O esquema geral de obtenção dos extratos é demonstrado na Figura 3.1.

FIGURA 3.1 - FLUXOGRAMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA



al. (2010). Este método avalia a adesão *in vitro* de bactérias (*Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028) às amostras por meio da densidade óptica das suspensões bacterianas, o que indica o crescimento das bactérias ligadas. Há uma relação inversa entre as densidades celulares iniciais (número de bactérias aderidas) e a taxa de crescimento: quanto maior o número de células bacterianas aderidas às amostras, mais rápido será o crescimento e menor será o tempo de detecção para atingir certo nível de densidade celular, indicando dessa forma, uma alta capacidade de adesão da amostra testada.

3.2.2.2 Parâmetros de Crescimento

Os parâmetros de crescimento foram determinados usando o modelo de cinética bacteriana (Equação 3.1) previamente descrito por Groot et al. (1996) e adaptado por Becker et al. (2007):

$$f_{OD}(t) = \frac{A}{1 + \frac{B^c}{t^c}} \quad (3.1)$$

onde, $f_{OD}(t)$ denota a densidade óptica do meio contido em cada poço da placa no tempo t após a incubação da mesma, A representa o valor da assíntota da densidade óptica no estado estacionário, B representa o tempo de incubação onde metade da densidade óptica máxima foi obtida e C é uma constante que determina o comportamento da curva.

A primeira derivada, $f'_{OD}(t)$ é:

$$f'_{OD}(t) = \frac{AB^c C}{t^{c+1} \left(1 + \frac{B^c}{t^c}\right)^2} \quad (3.2)$$

Além disso, pela segunda derivada da equação (3.1), pode-se determinar t_{pi} que é o tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva:

$$t_{pi} = B \left(\frac{C-1}{C+1} \right)^{1/c} \quad (3.3)$$

Assim também, a determinação da fase lag aparente ou o tempo de detecção, t_{det} (3.4), pode ser determinada pelas equações (3.1), (3.2) e (3.3):

$$t_{det} = t_{pi} - \frac{f_{OD}(t_{pi})}{f'_{OD}(t_{pi})} \quad (3.4)$$

Adicionalmente, foi determinado o tempo $t_{OD=0,1}$ (Equação 3.5), representando o tempo de detecção para se atingir a densidade óptica (OD) de 0,1 em 690 nm:

$$t_{OD=0,1} = \left(\frac{B^c(-0,1)}{0.1 - A} \right)^{1/c} \quad (3.5)$$

O tempo $t_{OD=0,1}$ assim obtido será avaliado em relação à quantidade de bactérias ligadas por meio da curva de calibração.

3.2.2.3 Inóculo e Condições de Cultura

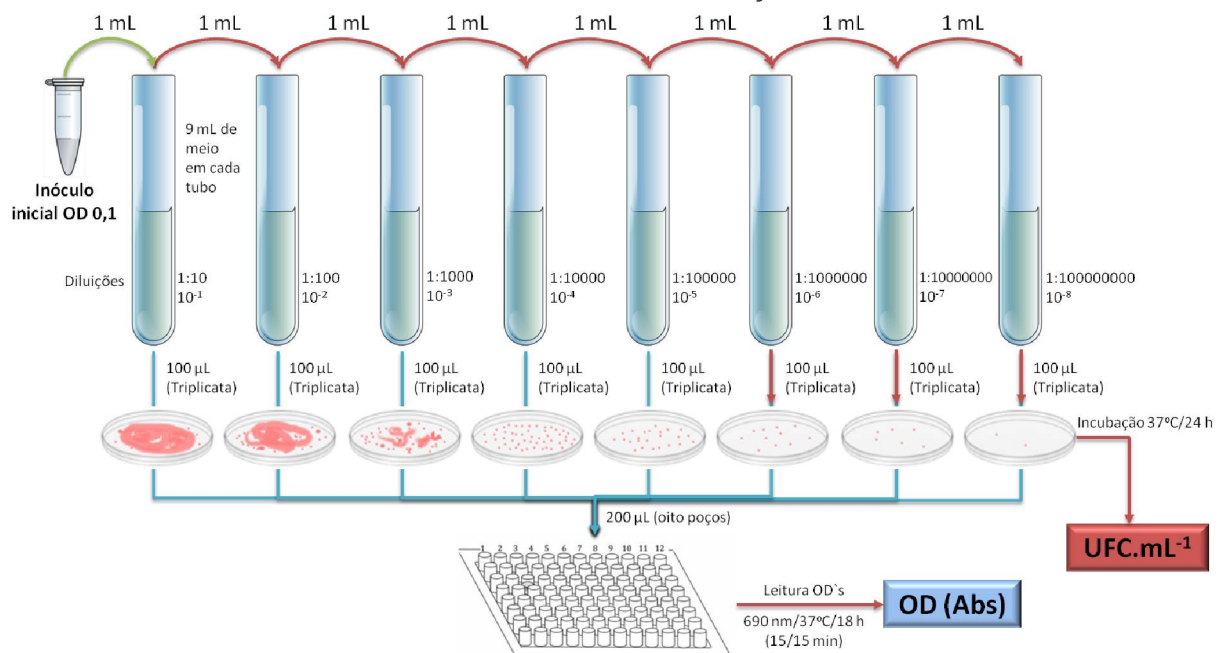
Os testes foram realizados com a enterobactéria *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028. As culturas estoque foram crescidas em caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração) e mantidas a -20°C com adição de glicerol 15% (v/v). As cepas foram cultivadas primeiramente em Ágar BHI, e crescidas por 24 h a 37°C em condições aeróbicas e estocadas por não mais do que duas semanas a 4°C. Para cultura, uma alçada de colônias foi inoculada em caldo TSB (Caldo Tripton de Soja) e crescida por 18 h a 37°C sem agitação. As culturas foram sucessivamente cultivadas, no mínimo cinco vezes, para enriquecer seletivamente as fímbrias do tipo I como descrito por Old e Duguid (1970) e Snellings, Tall e Venkatesan (1997). A OD das suspensões bacterianas foi ajustada para 0,1, em comprimento de onda de 690 nm, para os experimentos como descrito previamente por Ganner et al. (2010).

3.2.2.4 Curva de Calibração

Diluições seriadas de culturas frescas foram plaqueadas, em triplicata, em Ágar TSB, incubadas por 24 h, seguida de contagem das UFC. Simultaneamente, oito repetições de cada suspensão bacteriana (200 μL /poço) foram incubadas em leitor de microplacas, por 18 h a 37°C para determinação das características de crescimento. As ODs foram determinadas em comprimento de onda de 690 nm, em intervalos de 15 min. O esquema geral para realização da curva de calibração é apresentado na Figura 3.2.

A curva de calibração (regressão linear) foi compilada, plotando o tempo em horas necessário para cada uma das suspensões bacterianas atingir a fase exponencial (OD de 0,1 a 690 nm) em função do número de bactérias contadas nas placas de ágar (UFC·mL⁻¹), permitindo dessa forma, determinar o número de células bacterianas ligadas às amostras testadas.

FIGURA 3.2 - ESQUEMA GERAL PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO



FONTE: O autor (2016).

3.2.2.5 Ensaio de Capacidade de Adesão

Soluções das amostras em concentrações de 1% (m/v) foram dissolvidas em tampão fosfato salino (PBS: fosfato de sódio 10 mmol.L⁻¹; NaCl 0,15 mol.L⁻¹; pH

7,0), agitadas em vórtex e homogeneizadas em banho de ultrassom por 30 s por três vezes. Em seguida 300 µL dessas soluções foram transferidos em triplicata aos poços da placa de poliestireno de alta aderência. Após incubação a 4°C durante 16-18 h, a placa foi lavada três vezes com 300 µL de PBS por poço para remoção do material não ligado. O bloqueamento dos espaços não ocupados pelo produto e a prevenção de ligações inespecíficas se deu com 300 µL de BSA (Albumina Soro Bovina) 1% (m/v), 4°C, durante 1 h, seguida de lavagem com 300 µL de PBS por três vezes. Na sequência, 300 µL/poço de uma suspensão bacteriana foram adicionados à microplaca. As bactérias foram previamente crescidas, em meio TSB durante 2 h a 37°C, suspensas em PBS e tiveram a OD ajustada para 0,01 a 690 nm. A microplaca foi então incubada por 1 h a 37°C. Após lavagem por seis vezes com 300 µL de PBS, para retirar as bactérias que não se ligaram ao produto, foi adicionado TSB (200 µL), e uma gota de óleo de parafina, para que não houvesse evaporação do meio. Assim a placa foi incubada em leitor de microplacas (SpectraMax 340; Molecular Devices Ltd) a 37°C, com leituras a cada 15 min a 690 nm, por 16 h. Todas as leituras foram realizadas em três ensaios independentes (realizados em dias diferentes) e em triplicata por ensaio. A placa foi automaticamente agitada sob intensidade média por 3 s antes de cada leitura. O esquema geral para realização dos ensaios de capacidade de adesão é apresentado na Figura 3.3.

Controle de crescimento, controle negativo, controle positivo, controle do meio e branco das amostras foram também avaliados em cada ensaio. O controle de crescimento consistiu em poços previamente bloqueados com BSA, contendo uma suspensão bacteriana em meio TSB com OD 0,01. O controle negativo consistiu em poços contendo apenas o bloqueio com BSA e a bactéria sem adicionar o produto a ser testado. O produto comercial BioMos[®] da *Alltech* foi utilizado como controle positivo. Os brancos das amostras consistiram em poços previamente bloqueados com BSA, contendo o produto a ser testado sem adição de bactérias.

As curvas de crescimento das bactérias aderidas aos produtos testados foram referenciadas como curvas de adesão para distingui-las das curvas de crescimento obtidas a partir de diluição seriada da bactéria.

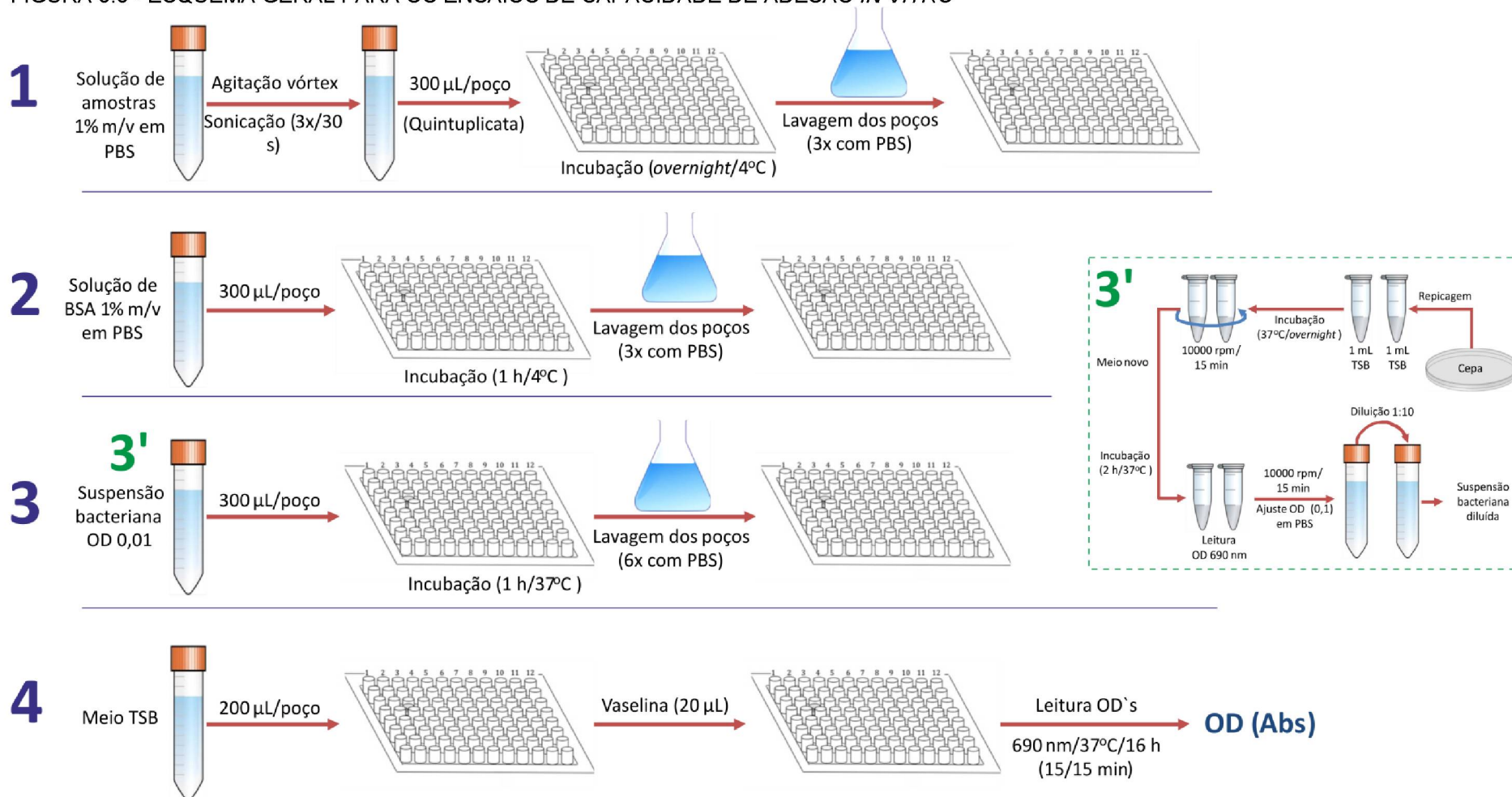
3.2.2.6 Tratamento dos Dados e Estatística

Os dados obtidos pelo programa da leitora de microplacas foram convertidos em arquivos de texto e analisados utilizando o Programa R (versão 2.15.1; *The R Foundation for Statistical Computing*). Todos os dados de OD foram processados aplicando a regressão não linear, equação 3.1, dada anteriormente. Os parâmetros então obtidos foram usados para calcular t_{pi} , t_{det} e $t_{OD=0,1}$ usando as equações 3.3, 3.4 e 3.5.

Os valores de $t_{OD=0,1}$, determinados para cada amostra foram transformados em número de UFC por meio da regressão linear obtida a partir da curva de calibração (Item 3.2.2.4), obtendo-se então o número de bactérias inicialmente ligadas às amostras testadas. O número de UFC deduzido para cada amostra foi comparado ao Controle Positivo, estabelecendo o número de bactérias ligadas ao controle como 100%.

Todos os parâmetros foram avaliados estatisticamente aplicando análise de variância (ANOVA). Diferenças entre médias foram determinadas usando teste de Tukey. Dados com p valor menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os gráficos foram gerados a partir do software GraphPad Prism 5 (version 5.03, GraphPad Software Inc, 2010, San Diego, USA).

FIGURA 3.3 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE CAPACIDADE DE ADESÃO *IN VITRO*



NOTA: 1) Incubação das amostras de interesse; 2) Bloqueio dos espaços não ocupados e prevenção de ligações inespecíficas com BSA; 3) Incubação das bactérias; 3') Preparo da suspensão bacteriana a ser incubada; 4) Adição de meio e leitura das densidades ópticas.

FONTE: Adaptado de RODRIGUES (2012).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Ensaio de Capacidade de Adesão

Os ensaios de capacidade de adesão *in vitro* 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 às frações testadas é mensurada pela densidade óptica das suspensões, o que indica o crescimento das bactérias aderidas.

O experimento foi realizado em microplacas com superfície de poliestireno de alta adesão que possibilitam a ligação de moléculas. Essa propriedade é decorrente de uma modificação do poliestireno para um estado elevado de ligação, por uso de radiação. 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 por meio de interações hidrofóbicas e iônicas (CORNING, 2015). As matrizes de adesão, alternativas aos receptores do epitélio intestinal, consistem principalmente de compostos glicosilados, se ligando as placas de poliestireno via ligação de hidrogênio (BECKER et al., 2007).

Este ensaio compreende quatro etapas principais: 1) incubação das amostras de interesse; 2) bloqueio dos espaços não ocupados pelas amostras e prevenção de ligações inespecíficas; 3) incubação da bactéria e por fim 4) adição de meio de cultura e leitura das densidades ópticas. Em todos os experimentos foram utilizados diferentes controles que consistiram em: controle negativo, controle positivo, controle de crescimento, branco da amostra e controle do meio de cultura.

O controle negativo ou controle de ligação consistiu em BSA e bactéria sem adição das moléculas de interesse a fim de eliminar os sítios de ligação inespecíficos. Embora o BSA seja um produto proteínáceo puro, diferente da matriz de adesão glicídica, ele não se comporta de maneira inerte perante a bactéria (BECKER; GALLETTI, 2008), resultando apenas em crescimento mais lento quando comparado às amostras testadas. Assim, o controle negativo não apresentou crescimento bacteriano antes de 5,5 h.

O controle positivo, utilizado neste estudo, consiste em um produto comercial derivado de parede celular de levedura. Produtos com essa composição

são amplamente comercializados em todo o mundo em razão de suas propriedades de adesão a enterobactérias. Inúmeros estudos *in vitro* (SALIT; GOTSCHLICH, 1977; KORHONEN et al., 1980; MIRELMAN; ALTMANN; ESHDAT, 1980; FERNANDEZ; HINTON; VAN GILS, 2000; 2002; BECKER; GALLETI, 2008; BOROWSKY; CORCAO; CARDOSO, 2009; GANAN et al., 2009; GANNER et al., 2010; BADIA et al., 2012; BADIA et al., 2013; GANNER et al., 2013) e *in vivo* (LINE et al., 1998; SPRING et al., 2000; HOFACRE et al., 2003; MOURÃO et al., 2006; BAURHOO et al., 2007; BIGGS; PARSONS, 2008; YANG. et al., 2008; BAURHOO; GOLDFLUS; ZHAO, 2009; JACOBS; PARSONS, 2009; EL-KHALEK et al., 2012) têm mostrado os benefícios desses produtos sobre a saúde e performance animal.

O controle de crescimento consistiu em uma suspensão bacteriana com OD 0,01 adicionada aos poços, previamente bloqueados com BSA, apenas na quarta etapa do processo. Esse controle permite identificar eventuais problemas ocorridos durante todo o processo de crescimento bacteriano.

Os brancos das amostras consistiram em amostras 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 poços contendo apenas o meio, a fim de identificar possíveis contaminações. Ambos os controles (brancos e controle do meio) não apresentaram crescimento antes de 10 h.

Em razão da baixa afinidade de lectinas bacterianas para sacarídeos (OFEK; HASTY; SHARON, 2003), uma alta concentração de carboidratos é requerida para efetiva adesão *in vitro*. Assim, a concentração escolhida para a realização dos ensaios foi de 1% m/v, ou seja, 3 mg de amostra/poço.

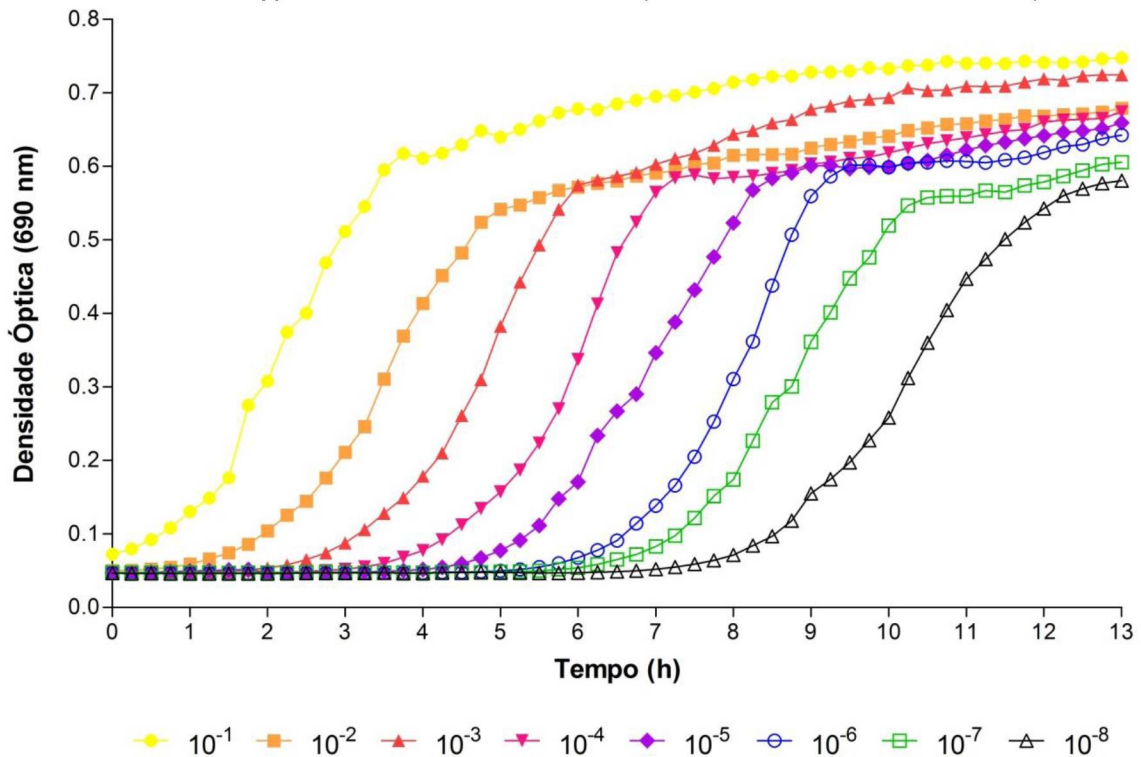
3.3.2 Curva de Calibração e Parâmetros de Crescimento

Para determinação da capacidade de adesão das frações de interesse a construção de uma curva de calibração é necessária. Para tanto, uma suspensão de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028 com densidade óptica de 0,1 foi submetida à diluição seriada (10^{-1} - 10^{-8}). Após o período de incubação e obtenção das suas respectivas densidades ópticas, curvas de crescimento foram plotadas (Gráfico 3.1). É possível observar que em uma faixa linear, a janela de medição do

equipamento utilizado permite detectar todas as densidades celulares entre 10^1 e 10^8 UFC.mL⁻¹.

O crescimento bacteriano normalmente apresenta fases distintas. Primeiramente, uma fase lag em que a taxa de crescimento se inicia em valor zero e acelera gradativamente a um valor máximo num certo período de tempo, após a taxa de crescimento diminui retornando ao valor inicial, atingindo a assíntota de crescimento (ZWIETERING; ROMBOUTS; RIET, 1992). Quando a curva de crescimento representa a contagem microbiana através do tempo, as variações da taxa de crescimento resultam em comportamento sigmoidal (ZWIETERING et al., 1990), como demonstrado no Gráfico 3.1, com uma fase lag iniciada após o tempo zero, seguida por uma fase exponencial e então uma fase estacionária.

GRÁFICO 3.1 - CURVAS DE CRESCIMENTO: TEMPO-DEPENDENTE DE APARECIMENTO DE *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028: LOG (DENSIDADE CELULAR INICIAL)



NOTA: Dados representam valores médios.

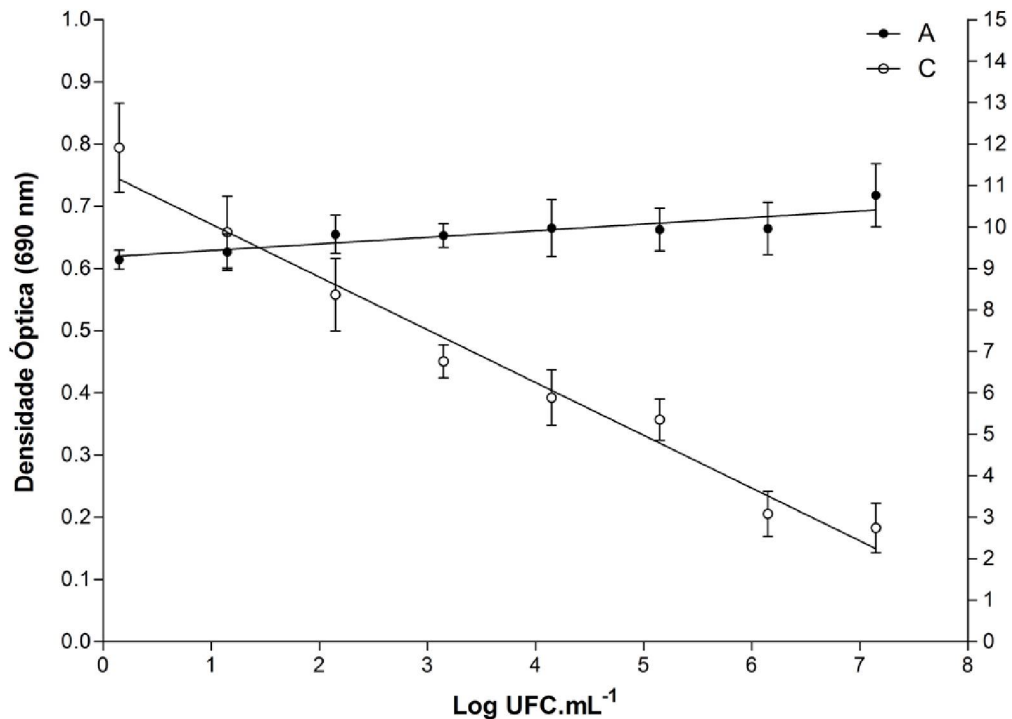
FONTE: O autor (2016).

Dessa forma um modelo sigmoidal (equação 3.1) foi aplicado a fim de determinar os parâmetros de crescimento da *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Modelos matemáticos têm sido amplamente utilizados para descrever o comportamento desses microorganismos frente às condições ambientais testadas

(ZWIETERING et al., 1990; BARANYI; PIN, 1999; DALGAARD; KOUTSOUMANIS, 2001; BARANYI; GEORGE; KUTALIK, 2009). Esses modelos proporcionam um caminho rápido para obtenção de dados confiáveis em relação aos parâmetros de crescimento.

O parâmetro *A* representa a densidade óptica assintótica na fase estacionária. Seus valores aumentam sutilmente em razão do aumento da densidade celular inicial (Gráfico 3.2). Inversamente, o parâmetro de crescimento *C*, que representa a constante que determina o comportamento da curva, diminui linearmente com o aumento da densidade inicial de células (Gráfico 3.2).

GRÁFICO 3.2 - CORRELAÇÃO ENTRE DENSIDADE CELULAR INICIAL E PARÂMETROS DE CRESCIMENTO *A* E *C*. *A* (OD) E *C*: PARÂMETROS DA CURVA SIGMOIDAL



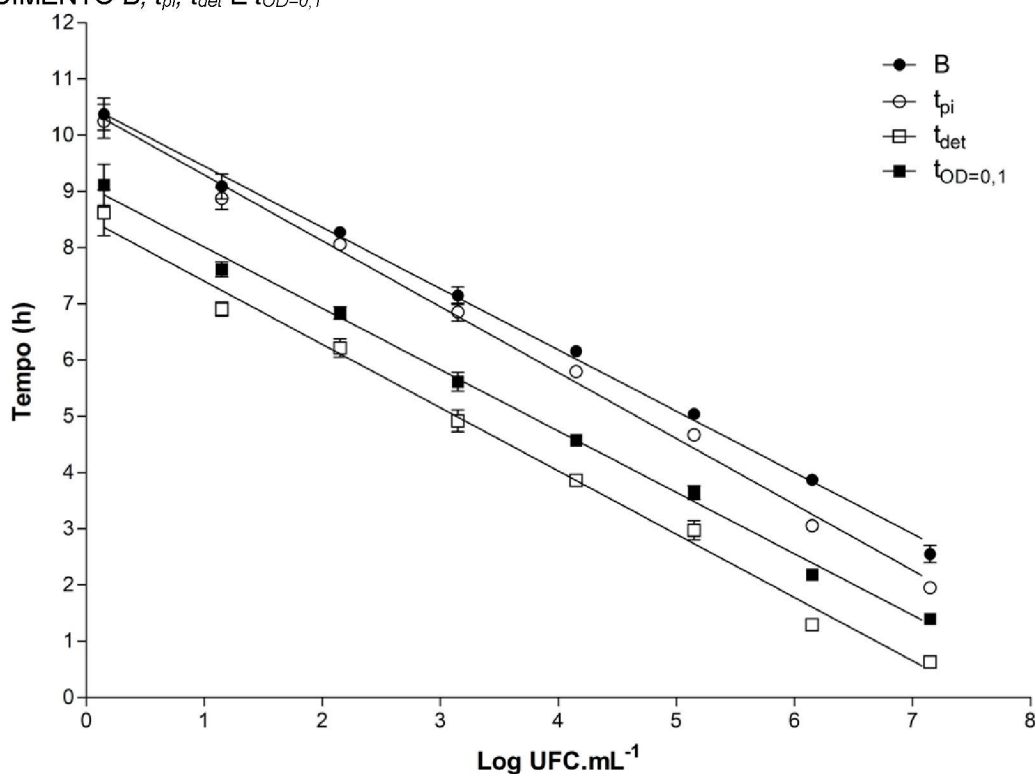
NOTA: Dados representam valores médios \pm DP.

FONTE: O autor (2016).

Outros parâmetros como *B* (tempo após incubação em que metade do crescimento máximo é atingido), t_{pi} (tempo que indica o ponto de inflexão da curva), t_{det} (tempo que indica a fase lag aparente) e $t_{OD=0,1}$ (tempo em horas necessário para bactéria atingir uma densidade óptica de 0,1) diminuem com o aumento da densidade inicial de células (Gráfico 3.3), sugerindo relações lineares entre esses parâmetros e as densidades celulares iniciais. O comportamento de todos os

parâmetros de crescimento obtidos para *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028 foram similares aos encontrados por Becker et al. (2007).

GRÁFICO 3.3 - CORRELAÇÃO ENTRE DENSIDADE CELULAR INICIAL E PARÂMETROS DE CRESCIMENTO B , t_{pi} , t_{det} E $t_{OD=0,1}$

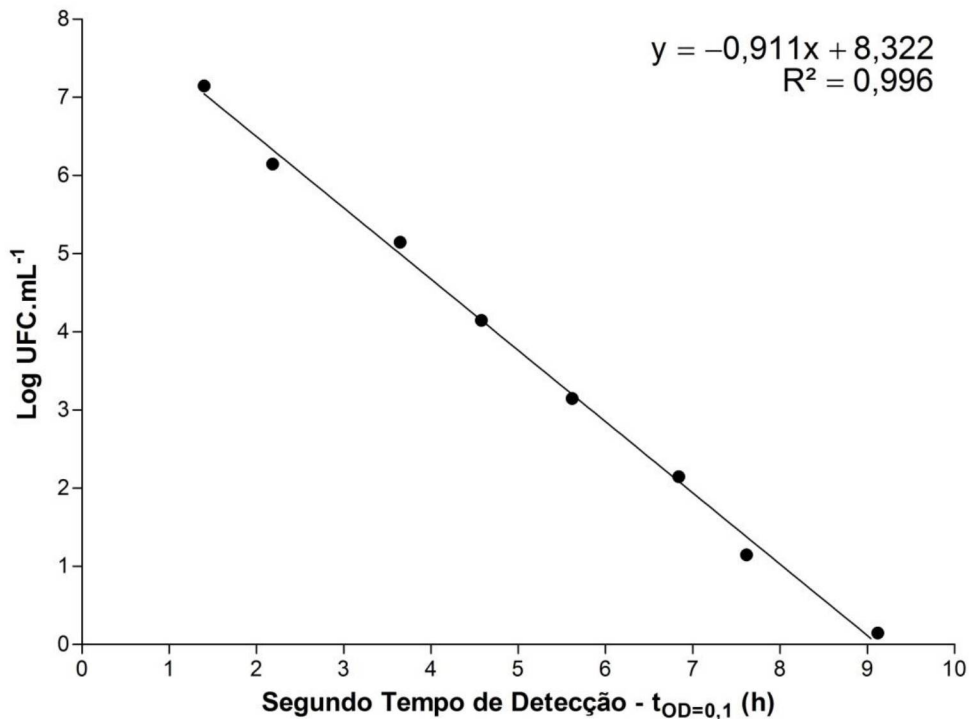


NOTA: B: parâmetro da curva sigmoidal; t_{pi} : ponto de inflexão; t_{det} : tempo de detecção; $t_{OD=0,1}$: tempo para OD=0,1. Dados representam valores médios \pm DP.

FONTE: O autor (2016).

A partir dos parâmetros obtidos, uma regressão linear foi compilada plotando $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ pelo tempo de detecção das diluições em série necessário para as suspensões bacterianas atingirem densidade óptica de 0,1 ($t_{OD=0,1}$) (Gráfico 3.4). O R^2 obtido para a regressão linear foi de 0,996, indicando um excelente ajuste do modelo. Aplicando essa regressão, a quantidade desconhecida de bactérias ligadas é calculada em função do tempo de detecção. Em um intervalo linear, foi possível a detecção das densidades celulares entre 1,41 e $1,41 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Quanto menor for a densidade celular inicial da solução, maior será o tempo necessário para que o crescimento bacteriano atinja densidade óptica de 0,1, o inverso é verdadeiro. Isto está relacionado à capacidade de adesão das moléculas de interesse, quanto maior o poder de adesão, maior o número de bactérias aderidas inicialmente às moléculas de interesse, mais rápido será o crescimento bacteriano e menor o tempo necessário para atingir a OD desejada.

GRÁFICO 3.4 - REGRESSÃO LINEAR PARA *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028

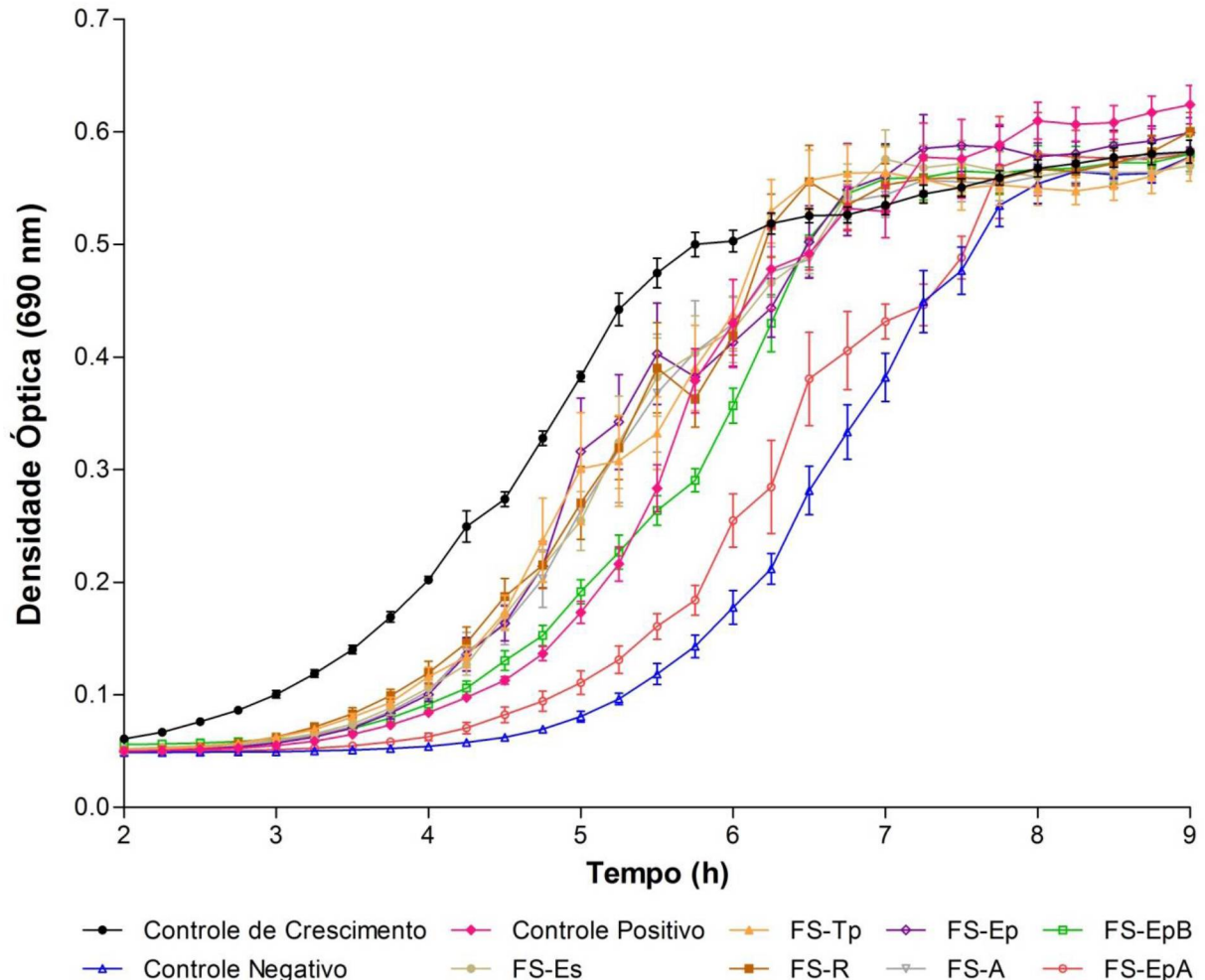
NOTA: Segundo tempo de detecção ($t_{OD=0,1}$): tempo em horas necessário para bactéria atingir uma densidade óptica de 0,1. Dados representam valores médios \pm DP.

FONTE: O autor (2016).

3.3.3 Determinação da Capacidade de Adesão dos Extratos obtidos de Farelo de Soja

O Gráfico 3.5 mostra as curvas de adesão para *Salmonella enterica* sv. Typhimurium em microplacas revestidas com as diferentes frações obtidas a partir de farelo de soja. Baseado na correlação entre o tempo e densidade celular inicial, é possível observar que as frações FS-Es, FS-Tp, FS-R, FS-Ep e FS-A se destacam das demais, indicando um maior número de bactérias inicialmente aderidas, evidenciando um alto poder de adesão. Além disso, é possível visualizar claramente que o controle negativo, contendo apenas BSA, necessita de um tempo maior para atingir sua fase exponencial em comparação às demais frações.

GRÁFICO 3.5 - CURVAS DE ADESÃO DE *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028 EM MICROPLACAS REVESTIDA COM AS AMOSTRAS



NOTA: Dados representam valores médios \pm DP.

FONTE: O autor (2016).

A partir das densidades ópticas obtidas para cada uma das amostras testadas, foram calculados os parâmetros de crescimento para a cepa em estudo (Tabela 3.1). Todos os produtos testados, com exceção da fração FS-EpA, aderiram significativamente mais bactérias que o controle negativo. A fração FS-Es apresentou capacidade de adesão superior ao controle positivo. As demais frações (FS-Tp, FS-R, FS-Ep, FS-A e FS-EpB) apresentaram potencial similar ao controle positivo.

Para o parâmetro *A* não houve diferença significativa entre as frações, resultados justificados em função de o parâmetro aumentar apenas sutilmente em razão do aumento da densidade celular inicial, conforme discutido anteriormente (Gráfico 3.2). Contudo é possível observar que a fração com maior potencial de adesão (FS-Es) atingiu valor assintótico de 0,71, resultado superior ao controle

negativo, que atingiu um valor assintótico de 0,58, indicando uma alta densidade inicial da fração com maior valor de *A*.

TABELA 3.1 - PARÂMETROS DE CRESCIMENTO PARA *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028 EM MICROPLACAS REVESTIDAS COM EXTRATOS DE FARELO DE SOJA

Amostras	A (OD)	B (h)	C	t_{pi} (h)	t_{det} (h)	$t_{OD=0,1}$ (h)	UFC/3 mg	% em relação ao C+
FS-Es	0,71	5,93 ^B	4,44 ^B	5,24 ^C	3,02 ^C	3,87 ^C	6,21 x 10 ⁴	431,3
FS-Tp	0,66	5,65 ^C	5,87 ^B	5,17 ^C	3,27 ^{B-C}	4,04 ^{B-C}	4,41 x 10 ⁴	306,3
FS-R	0,66	5,53 ^C	5,78 ^B	5,16 ^C	3,35 ^{B-C}	4,04 ^{B-C}	4,39 x 10 ⁴	304,9
FS-Ep	0,68	5,62 ^C	5,46 ^B	5,23 ^{C-D}	3,36 ^{B-C}	4,05 ^{B-C}	4,33 x 10 ⁴	300,7
FS-A	0,64	5,69 ^C	5,55 ^B	5,24 ^{C-D}	3,32 ^{B-C}	4,10 ^{B-C}	3,83 x 10 ⁴	266,0
FS-EpB	0,63	6,08 ^{B-C}	5,73 ^B	5,70 ^{B,D}	3,67 ^{B-C}	4,52 ^{B-D}	1,60 x 10 ⁴	111,1
Controle Positivo	0,73	6,28 ^B	6,38 ^B	5,90 ^B	3,94 ^B	4,57 ^B	1,44 x 10 ⁴	100,0
FS-EpA	0,67	6,91 ^A	6,64 ^B	6,54 ^A	4,44 ^{A-B}	5,21 ^A	3,76 x 10 ³	26,1
Controle Negativo	0,58	6,79 ^A	10,12 ^A	6,65 ^A	5,21 ^A	5,79 ^A	1,11 x 10 ³	7,7

NOTA: FS-Es: Fração do sobrenadante etanólico obtido após precipitação com TCA e etanol; FS-Tp: Fração insolúvel obtida após tratamento com TCA; FS-R: Resíduo da extração de farelo de soja; FS-Ep: Fração polissacarídica obtida após precipitação com TCA e etanol; FS-A: Extrato aquoso de farelo de soja; FS-EpA e FS-EpB: Frações eluídas com água destilada durante fracionamento cromatográfico da fração FS-Ep em Sepharose 6B. ^A Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

Em relação ao parâmetro *C*, todas as frações testadas foram diferentes significativamente do controle negativo. Como observado para a curva de calibração obtida para a cepa em estudo (Gráfico 3.2), baixas densidades celulares iniciais resultam em aumento no valor do parâmetro *C*. A fração com menor t_{OD} (FS-Es: 3,87 h), apresentou o menor valor de *C* (4,44). O inverso é observado com o controle negativo, onde obteve-se o maior t_{OD} (5,79 h) e o maior valor de *C* (10,12).

Para os demais parâmetros, *B*, t_{pi} , t_{det} e t_{OD} , observa-se um aumento progressivo dos valores entre as frações de maior e menor densidade celular inicial. Apenas a fração FS-EpA não apresentou diferença significativa, em relação ao controle negativo, para nenhum desses parâmetros. As diferenças para o parâmetro t_{OD} entre as frações e o controle negativo foram: FS-Es 1,92 h; FS-Tp e FS-R 1,75 h; FS-Ep 1,74 h; FS-A 1,69 h; FS-EpB 1,27 h; controle positivo 1,22 h e FS-EpA 0,58 h.

Todas as frações foram analisadas em três ensaios independentes, em triplicata. Para minimizar o coeficiente de variação dos ensaios, todos os experimentos foram realizados com o mesmo lote de inóculo. O coeficiente de

variação médio intra e inter ensaios, para a variável t_{OD} foi de aproximadamente 8,8%, valor próximo ao encontrado por Ganner et al. (2010).

A partir da regressão linear (Gráfico 3.4) foi calculado o número de bactérias aderidas inicialmente às amostras testadas (UFC/3 mg). Estes resultados estão em acordo com as curvas de adesão e demais parâmetros de crescimento obtidos. A fração com maior capacidade de adesão, FS-Es, foi capaz de aderir $6,21 \times 10^4$ UFC/3 mg de amostra; as demais frações, similares ao controle positivo, aderiram entre $1,60 - 4,41 \times 10^4$ UFC/3 mg de amostra. Embora apenas uma fração tenha apresentado resultado melhor que o produto comercial, os demais resultados obtidos se mostram importantes, uma vez que apresentaram-se estatisticamente equiparáveis ao produto comercial quanto à capacidade de adesão.

Comparando-se o número médio de bactérias aderidas de cada uma das frações ao produto comercial é possível verificar com maior clareza que a fração FS-Es se destaca das demais, aderindo 431,3% a mais de bactérias que o controle positivo. A fração semelhante ao controle negativo, FS-EpA, aderiu 73,9% a menos de bactérias que o controle positivo. As demais frações aderiram entre 111,1 – 306,3% a mais de bactérias que o controle positivo.

Becker et al. (2007) questionam a confiabilidade da quantificação de bactérias aderidas em razão da variação decorrente da quantidade de produto imobilizado na placa (primeira etapa do ensaio), fator desconhecido neste teste automatizado até então. Análises químicas (dosagens de carboidratos totais e proteínas) de diferentes amostras antes e após cada etapa de lavagem ocorrida no ensaio, permitiram identificar que aproximadamente 80% ($\pm 4\%$) (CV: 5%) de todo material inicialmente utilizado permanece imobilizado à placa após a etapa de lavagem, independentemente da natureza da amostra. Lavagens posteriores para retirada do excesso de BSA não removeu o material previamente imobilizado.

Todas as frações foram analisadas por métodos químicos e espectroscópicos (Tabela 3.2), como já apresentado em maiores detalhes no Capítulo 2. Embora estas frações apresentem em maioria capacidade de adesão similares, elas são quimicamente distintas. As frações FS-Es (sobrenadante etanólico), FS-Tp (precitado com TCA) e FS-R (resíduo da extração) apresentaram alto teor de proteínas (entre 58,0 – 86,8%) e baixo teor de carboidratos (8,7 – 22,0%). A fração FS-Ep, correspondente ao precipitado etanólico apresenta alto teor de carboidratos (85,0%) e baixos teores de proteínas (4,7%). O extrato aquoso

FS-A, diferentemente, apresentou quantidades equiparáveis de proteínas e carboidratos, 39,1 e 37,2%, respectivamente.

TABELA 3.2 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Fração	PTN (%) ^a	Carboidratos Totais (%) ^b	Composição Monossacarídica (mol%) ^c							
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^d
FS-Es	58,0	21,2	1,3	tr	10,2	tr	tr	2,6	tr	85,8
FS-Tp	86,8	8,7	1,8	2,8	13,9	2,9	22,9	5,6	21,3	28,7
FS-R	62,5	22,0	5,9	2,4	15,9	19,1	8,3	27,5	15,7	5,2
FS-Ep	4,7	85,0	8,3	1,0	15,2	5,8	2,0	28,4	6,8	32,5
FS-A	39,1	37,2	tr	tr	24,5	3,5	2,1	46,9	4,0	19,0
FS-EpB	4,8	95,9	-	-	8,5	tr	-	73,4	14,8	3,3
FS-EpA	3,3	93,9	4,1	1,9	5,7	4,8	-	38,3	7,3	37,9

NOTA: PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; FS-Es: Fração do sobrenadante etanólico obtido após precipitação com TCA e etanol; FS-Tp: Fração insolúvel obtida após tratamento com TCA; FS-R: Resíduo da extração de farelo de soja; FS-Ep: Fração polissacarídica obtida após precipitação com TCA e etanol; FS-A: Extrato aquoso de farelo de soja; FS-EpA e FS-EpB: Frações eluídas com água destilada durante fracionamento cromatográfico da fração FS-Ep em Sepharose 6B. ^a Lowry et al. (1951); ^b Dubois et al. (1956); ^c Monossacarídeos neutros quantificados como acetato de alditóis; ^d Filizetti-Cozzi, Carpita (1991); tr: percentagem menor ou igual a 1,0%; -: não detectado.

FONTE: O autor (2016).

De modo geral, as frações obtidas apresentam arabinose, galactose e ácidos urônicos como constituintes majoritários. Glucose, xilose e manose aparecem em quantidades significativas nas frações FS-Tp e FS-R. As frações FS-EpA e FS-EpB derivam da fração FS-Ep e correspondem a dois grupos distintos de polissacarídeos, um primeiro grupo de alta massa molar (\cong 500 kDa) composto por pectinas e um segundo grupo de baixa massa molar (\cong 8 kDa) composto por galactanas.

Correlacionando os resultados de capacidade de adesão e a composição química das frações testadas é possível sugerir que tanto as proteínas quanto os carboidratos podem estar envolvidos no mecanismo de adesão, uma vez que frações ricas em proteínas (FS-Tp, FS-R, FS-Es) ou em carboidratos (FS-Ep), ou ainda com proporções equiparáveis desses grupos (FS-A) apresentaram alta capacidade de adesão. Polissacarídeos do tipo pectinas, extraídos de farelo de soja e presentes na fração FS-EpA não apresentaram capacidade de adesão, indicando que a presença de altas quantidades de açúcares ácidos pode estar inibindo ou dificultando o processo de adesão.

3.3.4 Mecanismos de Adesão

Não é possível avaliar, a partir do método utilizado, o mecanismo exato envolvido na ligação entre os extratos de farelo de soja e a bactéria. Entretanto, pode-se inferir diferentes considerações, levando-se em conta a característica dos extratos obtidos e o estado da arte a cerca das adesinas de reconhecimento presentes na *Salmonella enterica* sv. Typhimurium.

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 sorotipo (sorovar), genes para vários tipos de adesinas fimbriais são identificadas (WAGNER; HENSEL, 2011). Para a *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, objeto deste estudo, já foram 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*) e *Std* envolvidos na ligação ao epitélio intestinal; o *Fim* que codifica a fímbria tipo I; o *Tafi/Agf* (*thin aggregative fimbriae*) que está envolvido na síntese de um fino agregado de fímbrias denominado “*curli*”; o *shdA* e *misL* que codificam proteínas autotransportadoras envolvidas na ligação de proteínas da matriz extracelular (DARWIN; MILLER, 1999; DORSEY et al., 2005; VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005; FRONZES; REMAUT; WAKSMAN, 2008; CHESSA et al., 2009; WAGNER; HENSEL, 2011). Também já foram descritos outros genes que codificam adesinas fimbriais para este sorovar: *Bcf*, *Saf*, *Stb*, *Stc*, *Stf*, *Sth*, *Sti* e *Stj*, no entanto, a funcionalidade destes genes ainda não é totalmente elucidada (WEENING et al., 2005; YUE et al., 2012; FÀBREGA; VILA, 2013). A incompreensão das propriedades estruturais e funcionais de adesinas para este gênero é decorrente ao fato de que a interação entre as adesinas e receptores específicos têm sido bem documentada e relatada para espécies de *E. coli*, apenas uma minoria dos estudos envolve a identificação e caracterização experimental de adesinas de *Salmonella* (WAGNER; HENSEL, 2011; YUE et al., 2012).

Dentre os diferentes tipos de fímbrias descritas para o sorovar Typhimurium, as fímbrias de tipo I são descritas como contribuintes principais para a fixação em enterócitos e colonização do intestino (FRONZES; REMAUT; WAKSMAN, 2008; MORAN, 2009). A fímbria tipo I é composta majoritariamente pela subunidade FimA (98%), entretanto, é a subunidade FimH que representa a lectina fimbrial, indispensável à ligação ao epitélio (SOKURENKO et al., 1994; JONES et al., 1995).

FimH é altamente específica para resíduos de manose (SOKURENKO et al., 1994; LINDHORST; KIEBURG; KRALLMANN-WENZEL, 1998; WEISSMAN et al., 2003; GRZYMAJLO et al., 2010), no entanto, estudos tem demonstrado que variantes alélicas para FimH, comumente encontrados em sorovar Typhimurium, podem ser responsáveis por alterações das propriedades de ligação dessas fimbrias, levando a mudanças de afinidade ou até mesmo alterações da especificidade (GUO et al., 2009). Além disso, o processo de adesão pode envolver outros fatores além das interações adesina-receptor, como interações hidrofóbicas ou ligações inespecíficas em diferentes níveis de força (OFEK; HASTY; SHARON, 2003).

Neeser, Koellreutter e Wuersch (1986), Neeser e Wursch (1990), Kiers et al. (2002), Kiers et al. (2003), Becker et al. (2007) e Becker e Galletti (2008) já demonstraram em seus trabalhos a capacidade de derivados de soja em adsorver enterobactérias como *Salmonella* sp. e *E. coli*, de modo a evitar a colonização subsequente do patógeno. A capacidade de ligação evidenciada para soja, nesses trabalhos, foi correlacionada à presença de manose nos extratos e sua respectiva ligação às lectinas da bactéria.

Apenas duas frações que apresentaram capacidade de adesão, FS-Tp e FS-R, contém manose em sua composição num teor considerável significativo, 22,9 e 8,3 mols%, respectivamente. No entanto, seu conteúdo absoluto é baixo, correspondendo a 2% na fração FS-Tp e 1,8% na fração FS-R. É possível que a manose, mesmo em baixos teores, possam estar atuando como receptores análogos, em função da alta especificidade por este açúcar. Além disso, as bactérias não reconhecem apenas terminais redutores de carboidratos, os reconhecem também em ligações internas (SHARON; OFEK, 2000), podendo dessa forma, reconhecer resíduos de manose presentes em cadeias constituídas majoritariamente por outros monossacarídeos.

Bouckaert et al. (2005) analisaram a afinidade de adesinas FimH, de *E. coli*, frente a diferentes monossacarídeos e dissacarídeos. Seus resultados evidenciaram que FimH pode se ligar a outros sacarídeos, como frutose e glucose, no entanto sua afinidade é reduzida quando comparada a manose. Trabalhos anteriores realizados por Old (1972), Salit e Gotschlich (1977), Korhonen et al. (1980), Ashkenazi e Mirelman (1984), Sanchez et al. (1993) e Spring et al. (2000) já haviam demonstrado a capacidade de adesão de diferentes espécies de *Salmonella* e *E. coli* para estes mesmos monossacarídeos. A maioria das frações testadas, neste trabalho,

apresentam glucose em sua composição, com teores absolutos variando entre 1,8 e 14,3%, sugerindo que a glucose possa estar envolvida no processo de adesão das bactérias aos extratos de soja.

Além de manose e glucose, outros monossacarídeos podem estar interagindo com adesinas da *Salmonella*. Todas as frações bioativas apresentam em sua composição galactose, arabinose e ácidos urônicos. Outros monossacarídeos aparecem em menores quantidades. Há relatos na literatura de inibição da adesão de *Salmonella* por D-Galactose, L-Arabinose e L-Fucose (MCHAN et al., 1989; OYOFO et al., 1989; CHESSA et al., 2009; PARKER et al., 2010; SAKARYA et al., 2010). Oligossacarídeos não digeríveis, como galactoligossacarídeos também já foram relatados como inibidores de adesão e invasão de *Salmonella* em linhagem de células intestinais humanas e experimentos *in vivo* com ratos (TZORTZIS et al., 2005; SEARLE et al., 2009; SEARLE et al., 2010). Extratos aquosos de farelo de soja, extraídos anteriormente, apresentaram potencial de adesão 262% maior que o controle positivo (RODRIGUES, 2012). A fração FS-A, correspondente ao mesmo extrato aquoso, apresentou nesse trabalho, um potencial de adesão de 266% em relação ao controle, indicando que a variabilidade inerente ao farelo de soja utilizado não interferiu na extração de moléculas bioativas.

Polissacarídeos pécticos, obtidos de kiwi e banana-da-terra, compostos majoritariamente por ácidos urônicos e menores quantidades de galactose e arabinose diminuíram a adesão de *S. enterica* sv. Typhimurium a células intestinais (PARKAR et al. 2010; ROBERTS et al. 2013). No entanto, polissacarídeos ácidos, extraídas de farelo de soja em trabalho anterior, apresentaram baixo potencial de adesão, aderindo 66 – 99,8% a menos de bactérias que o controle positivo (RODRIGUES, 2012). A fração FS-EpA, correspondente a polissacarídeos ácidos semelhantes aos obtidos em trabalho anterior, também apresentou capacidade de adesão inferior ao produto comercial utilizado, ligando 73,9% menos de bactérias que o controle positivo. Esses resultados indicam que a presença de grandes quantidades de açúcares ácidos pode desfavorecer a adesão bacteriana. Adicionalmente, a estrutura tridimensional desses polímeros pode ser desfavorável, uma vez que, além da composição a estrutura dos polímeros também é relatada como fator crítico para o processo de adesão (BOUCKAERT et al., 2005; GANNER et al., 2013).

A soja é um alimento essencialmente fornecedor de proteínas, essas proteínas de soja podem estar relacionadas com o processo de adesão uma vez que as bactérias podem expressar mais de um tipo de adesina durante este processo (OFEK; HASTY; SHARON, 2003). Há relatos de redução da adesão de *Salmonella* por β -conglucina, um glicopeptídeo altamente presente na soja (YANG et al., 2008). Shoaf-Sweeney e Hutkins (2008) propõem que a afinidade de adesão é definida pela valência entre as interações proteínas-carboidratos; uma molécula de carboidrato isolada apresentará menor afinidade que uma estrutura complexa envolvendo unidades proteicas e glicídicas. Dado o elevado conteúdo de proteínas observadas nos extratos com maior capacidade de adesão (FS-Es: 58%; FS-Tp: 86,8%; FS-R: 62,5%), é possível que exista alguma interação entre as adesinas e proteínas. As proteínas podem ainda estar atuando sinergicamente aos carboidratos.

O mecanismo anti-adesão para *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ainda não está totalmente elucidado (SPRING; PRIVULESCU, 1998; HAJATI; REZAEI, 2010). A possibilidade de o patógeno expressar diferentes genes para mais de um tipo de adesina, e num processo infeccioso expressar mais de uma adesina dificulta o processo de elucidação (OFEK; HASTY; SHARON, 2003). Adicionalmente, as propriedades de muitas estruturas envolvidas no processo de adesão da *Salmonella* ainda não foram completamente compreendidas (KISIELA et al., 2011; WAGNER; HENSEL, 2011; YUE et al., 2012).

Correlacionando todos os resultados obtidos e a literatura disponível, é possível evidenciar que a presença de manose não é o único fator responsável pela ligação da bactéria às moléculas de interesse, outros fatores/biomoléculas podem estar participando do processo de adesão, atuando de forma sinérgica, e envolvendo mecanismos ainda não elucidados ou desconhecidos. Desta forma, mais estudos são necessários a fim de identificar as interações envolvidas no processo de adesão de *S. enterica* sv. Typhimurium, e conseqüentemente definir qual é a melhor molécula para esta aplicação. Experimentos *in vivo*, envolvendo animais desafiados, poderão contribuir para uma validação do potencial de adesão dos extratos de farelo de soja, além de fornecer informações importantes a nível imunológico.

3.4 CONCLUSÕES

Diferentes frações, oriundas de farelo de soja foram avaliadas quanto à capacidade de adesão *in vitro* à *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Exceto pela fração FS-EpA (composta por polissacarídeos pécticos de alta massa molar), todas as frações testadas demonstraram capacidade de adesão equivalente ao controle positivo (produto comercial derivado de parede celular de leveduras).

Essas frações apresentaram composições diversas quanto à teores de proteínas e carboidratos. Frações ricas em proteínas (86,8%) e ricas em carboidratos (85,0%) apresentaram capacidade de adesão. Todas as frações bioativas apresentam em sua composição galactose, arabinose e ácidos urônicos. Outros monossacarídeos, como glucose e manose, aparecem em menores quantidades. A presença de polissacarídeos ácidos pode estar inibindo/dificultando o processo de ligação, uma vez que EA-EpA, constituída por uma pectina, não apresentou capacidade de adesão. Resultados indicam que outros fatores/biomoléculas, além da manose estão participando do processo de adesão.

Os resultados obtidos demonstram o potencial biotecnológico dos extratos quimiotransformados de farelo de soja na prevenção de infecções causadas por enterobactérias. As consequências de seu uso podem ser a redução do uso de antibióticos na pecuária.

REFERÊNCIAS

- ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 3189-3218, 2011.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Targeting virulence to prevent infection: to kill or not to kill? **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 4, p. 483-489, 2004.
- ASHKENAZI, S.; MIRELMAN, D. The effect of postnatal age on the adherence of *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* 0124, and *E. coli* 0128 to guinea pig intestinal cells. **Pediatric Research**, v. 18, n. 12, p. 1366-1371, 1984.
- BADIA, R. et al. β -Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardii modulate the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, p. 368-376, 2012.
- _____. Oligosaccharide structure determines prebiotic role of β -galactomannan against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium *in vitro*. **Gut Microbes**, v. 4, n. 1, p. 72-75, 2013.
- BARANYI, J.; GEORGE, S. M.; KUTALIK, Z. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times. **Journal of Theoretical Biology**, v. 259, n. 1, p. 24-30, 2009.
- BARANYI, J.; PIN, C. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 732-736, 1999.
- BARDIAU, M.; SZALO, M.; MAINIL, J. G. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. **Veterinary Research**, v. 41, n. 5, p. 57, 2010.
- BAURHOO, B.; GOLDFLUS, F.; ZHAO, X. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2, p. 133-137, 2009.
- BAURHOO, B. et al. Cecal populations of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* populations after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. **Poultry Science**, v. 86, n. 12, p. 2509-2516, 2007.
- BECKER, P. M. Physiological Achilles' heels of enteropathogenic bacteria in livestock. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 31-54, 2005.
- BECKER, P. M.; GALLETTI, S. Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 11, p. 2026-2035, 2008.

- BECKER, P. M. et al. Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2686-2696, 2007.
- BEHRAVESH, C. B.; WILLIAMS, I. T.; TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens and problems: expanding prevention efforts before slaughter or harvest. In: INSTITUTE OF MEDICINE. **Improving food safety through a One Health approach**. Washington: National Academies Press, 2012. cap. A14, p. 307-330.
- BIGGS, P.; PARSONS, C. M. The effects of Grobiotic-P on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, v. 87, n. 9, p. 1796-1803, 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.
- BOROWSKY, L.; CORCAO, G.; CARDOSO, M. Mannan oligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 458-464, 2009.
- BOUCKAERT, J. et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 441-455, 2005.
- CALLAWAY, T. R. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 217-225, 2008.
- CHESSA, D. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal $\alpha(1,2)$ -fucose residues in the cecal mucosa. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 864-875, 2009.
- CORNING. **Immobilization Principles – Selecting the Surface ELISA Technical Bulletin - Nº.1**. Disponível em: <<http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/elisa1.pdf>>. Acesso em: 04/01/2016.
- CRIM, S. M. et al. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**, v. 63, n. 15, p. 328-332, 2014.
- DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, n. 3, p. 183-196, 2001.
- DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.

DORSEY, C. W. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 196-211, 2005.

EFSA/ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 3991-4153, 2015.

EL-KHALEK, E. A. et al. Indirect evidence for microbiota reduction through dietary mannanoligosaccharides in the pigeon, an avian species without functional caeca. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 1084-1090, 2012.

FDA. **Drug use review**. Rockville: Food and Drug Administration - Department of Health and Human Services, Office of Surveillance and Epidemiology, 2012.

_____. **2010 Summary Report - antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals**. Rockville: Food and Drug Administration - Department of Health and Human Services, 2014.

FERNANDEZ, F.; HINTON, M.; VAN GILS, B. Evaluation of the effect of mannan-oligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chicks. **Avian Pathology**, v. 29, p. 575-581, 2000.

_____. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. **Avian Pathology**, v. 31, n. 1, p. 49-58, 2002.

FRONZES, R.; REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 17, p. 2271-2280, 2008.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308-341, 2013.

GANAN, M. et al. Inhibition by yeast-derived mannoproteins of adherence to and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 55-59, 2009.

GANNER, A. et al. Quantitative evaluation of E. coli F4 and *Salmonella typhimurium* binding capacity of yeast derivatives. **AMB Express**, v. 3, p. 62, 2013.

_____. 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, n. 2, p. 168-174, 2010.

GROOT, J. C. J. et al. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 77-89, 1996.

GRZYMAJLO, 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, n. 6, p. 1738-1748, 2010.

GULLBERG, E. et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. e1002158, 2011.

GUO, A. et al. FimH alleles direct preferential binding of *Salmonella* to distinct mammalian cells or to avian cells. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1623-1633, 2009.

GUPTA, K. et al. Cranberry products inhibit adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells. **The Journal of Urology**, v. 177, n. 6, p. 2357-2360, 2007.

HAJATI, H.; REZAEI, M. The application of prebiotics in poultry production. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 3, p. 298-304, 2010.

HOFACRE, C. L. et al. Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control *Necrotic enteritis*. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 1, p. 60-64, 2003.

JACOBS, C. M.; PARSONS, C. M. The effect of Grobiotic-P combined with yeast cell wall and gluconic acid on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, v. 88, n. 11, p. 2360-2367, 2009.

JONES, C. H. et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 2081-2085, 1995.

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

_____. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 311-315, 2002.

KISIELA, D. I. et al. Allosteric catch bond properties of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38136-38147, 2011.

KORHONEN, T. K. et al. Characterization of type 1 pili of *Salmonella typhimurium* LT2. **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 2, p. 800-805, 1980.

LINDHORST, T. K.; KIEBURG, C.; KRALLMANN-WENZEL, U. Inhibition of the type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli* to erythrocytes by multiantennary alpha-mannosyl clusters: the effect of multivalency. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, n. 6, p. 605-613, 1998.

LINE, J. E. et al. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. **Poultry Science**, v. 77, n. 3, p. 405-410, 1998.

MCHAN, F. et al. *In vitro* attachment of *Salmonella typhimurium* to chick ceca exposed to selected carbohydrates. **Avian Diseases**, v. 33, n. 2, p. 340-344, 1989.

MIRELMAN, D.; ALTMANN, G.; ESHDAT, Y. Screening of bacterial isolates for mannose-specific lectin activity by agglutination of yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 328-331, 1980.

MORAN, C. A. Nutritional approaches to controlling *Salmonella*. **Pig Progress**, v. 25, n. 2, 2009.

MOURÃO, J. L. et al. Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 1-2, p. 107-120, 2006.

NEESER, J.-R.; WURSCH, P. **Glycopeptide and oligosaccharide antibacterial compositions**. US4939123, Jul. 3, 1990.

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. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 2, p. 428-436, 1986.

NEWELL, D. G. et al. Foodborne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. Suppl 1, p. S3-S15, 2010

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, n. 5595, p. 623-625, 1977.

OLD, D. C. Inhibition of the interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by D-Mannose and other carbohydrates. **Journal of General Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 149-157, 1972.

OLD, D. C.; DUGUID, J. P. Selective outgrowth of fimbriate bacteria in static liquid medium. **Journal of Bacteriology**, v. 103, n. 2, p. 447-456, 1970.

OYOFO, B. A. et al. Inhibition by mannose of *in vitro* colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v. 68, n. 10, p. 1351-1356, 1989.

PARKER, P. et al. Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, n. 1, p. 89-97, 2010.

PIRNAY, J. P. et al. The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure? **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 4, p. 934-937, 2011.

RODRIGUES, J. M. **Capacidade de Ligação In Vitro à Bactérias Enteropatogênicas dos Extratos Isolados de Farelo de Soja**. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SAKARYA, S. et al. Sialic acid is required for nonspecific adherence of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhi on Caco-2 cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 58, p. 330-335, 2010.

SALIT, I. E.; GOTSCHLICH, E. C. Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 5, p. 1169-1181, 1977.

SANCHEZ, R. et al. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* cells expressing F17 fimbriae to small intestinal mucus and brush-border membranes of young calves. **Microbial Pathogenesis**, v. 15, n. 6, p. 407-419, 1993.

SANTOS, F. S. D. L. et al. The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market-aged broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, n. 1, p. 61-64, 2009.

SEARLE, L. E. et al. A mixture containing galactooligosaccharide, produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 37-48, 2009.

_____. Purified galactooligosaccharide, derived from a mixture produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adhesion and invasion *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 1428-1439, 2010.

SHARON, N.; OFEK, I. Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. **Glycoconjugate Journal**, v. 17, n. 7-9, p. 659-664, 2000.

SHOAF-SWEENEY, K. D.; HUTKINS, R. W. Chapter 2: Adherence, Anti-Adherence, and Oligosaccharides: Preventing Pathogens from Sticking to the Host. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 55, p. 101-161, 2008.

SNELLINGS, N. J.; TALL, B. D.; VENKATESAN, M. M. Characterization of *Shigella* type 1 fimbriae: expression, FimA sequence, and phase variation. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2462-2467, 1997.

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.

SPRING, P.; PRIVULESCU, M. Mannanligosaccharide: its logical role as a natural feed additive for piglets. Biotechnology in the feed industry. In: Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium, 1998, Kentucky. **Anais...** Kentucky: Alltech, 1998. p. 21-27.

SPRING, P. et al. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, n. 2, p. 205-211, 2000.

THOMAS, R. J. Receptor mimicry as novel therapeutic treatment for biothreat agents. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 1, p. 17-30, 2010.

THORNS, C. Bacterial foodborne zoonoses. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 19, n. 1, p. 226-239, 2000.

TZORTZIS, G. et al. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1726-1731, 2005.

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

WAGNER, C.; HENSEL, M. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 715, p. 17-34, 2011.

WEENING, E. H. et al. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3358-3366, 2005.

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

WHO. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: World Health Organization, 2014.

WILSON, J. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216-224, 2002.

WITTSCHIER, N. et al. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 6, p. 777-786, 2007.

YANG, B. et al. Glycopeptide derived from soybean β -conglycinin inhibits the adhesion of *Escherichia coli* and *Salmonella* to human intestinal cells. **Food Research International**, v. 41, n. 6, p. 594-599, 2008.

YANG, Y. et al. Effects of dietary mannanoligosaccharide on growth performance, nutrient digestibility and gut development of broilers given different cereal-based diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 650-659, 2008.

YUE, M. et al. Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro- and microevolution. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38596, 2012.

ZHAO, S. et al. Characterization of *Salmonella Typhimurium* of animal origin obtained from the national antimicrobial resistance monitoring system. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 2, p. 169-181, 2005.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.

ZWIETERING, M. H.; ROMBOUTS, F. M.; RIET, K. V. T. Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 2, p. 139-145, 1992.

CAPÍTULO 4

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE FARELO DE SOJA COM ALTA CAPACIDADE DE ADESÃO A ENTEROBACTÉRIAS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS FRAÇÕES OTIMIZADAS

4.1 INTRODUÇÃO

Otimizar refere-se a melhorar o desempenho de um sistema, um processo, ou um produto, a fim de obter o máximo de benefícios (BEZERRA et al., 2008). O termo otimização tem sido comumente usado como sinônimo de encontrar as condições em que um processo produzirá as melhores respostas possíveis (ARAUJO; BRERETON, 1996).

Tradicionalmente, a otimização de processos é realizada monitorando a influência de uma variável por vez sobre a resposta experimental (análise univariada ou “*one factor at a time*”). Enquanto apenas um parâmetro for alterado, os outros são mantidos em nível constante. Como resultado, grande número de experimentos é necessário para descrever o efeito individual de cada fator (BEZERRA et al., 2008). Este tipo de abordagem além de laborioso, oneroso e demorado, pode gerar resultados não confiáveis e imprecisões de resultados, uma vez que é incapaz de determinar efeitos interativos entre fatores em função de não explorar completamente o espaço de soluções (PASEEPHOL; SMALL; SHERKAT, 2007). Outro método tradicional é a utilização de matrizes completas de combinação de fatores. Este método explora todo o espaço experimental, porém necessita de um excessivo número de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

De modo a resolver estes problemas, a otimização de processos tem sido realizada utilizando técnicas de estatística multivariada. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) está entre as técnicas de análise multivariada mais relevantes usadas na otimização de processos. A MSR é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas efetivas para otimização de processos complexos, baseadas no ajuste de uma equação polinomial para os dados experimentais, os quais devem descrever o comportamento de um conjunto de fatores, com o objetivo de fazer previsões estatísticas de dados (BEZERRA et al., 2008). A principal vantagem da MSR é a avaliação da influência e interações de muitas variáveis sobre uma ou mais características do processo ou produto, utilizando o mínimo necessário de recursos e dados quantitativos de um projeto (YE; JIANG, 2011). Esta técnica de otimização tem sido largamente usada em processos envolvendo produção de polissacarídeos e proteínas a partir de diferentes materiais (DIPTEE et al., 1989; FAVERI et al., 2004; QUANHONG; CAILI, 2005; LINGYUN et al., 2007; GAN; ABDUL MANAF;

LATIFF, 2010; GUO; ZOU; SUN, 2010; XIA et al., 2011; YE; JIANG, 2011; ZOU et al., 2011).

O passo inicial para uma otimização utilizando MSR é a determinação das variáveis, ou fatores independentes, que interferem num processo. A escolha da metodologia do planejamento experimental está diretamente ligada ao número de fatores que se deseja avaliar (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Entre as técnicas pertencentes ao grupo de MSR, o Delineamento Composto Central (DCC) é a escolha mais popular para montagem de um modelo de segunda ordem, pois é capaz de gerar respostas eficientes requerendo poucos ensaios (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2001).

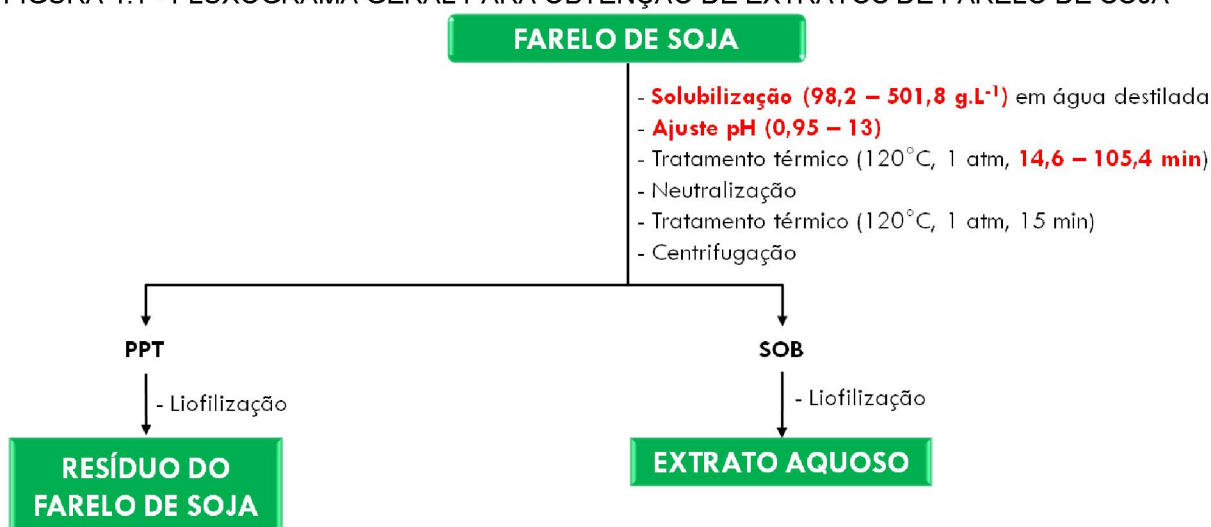
Os objetivos deste capítulo foram, portanto, avaliar a influência e otimizar as variáveis de processo (pH, tempo e concentração de farelo de soja) visando maximizar a produção de extratos de farelo de soja com alta capacidade de adesão a enterobactérias, utilizando MSR, aplicando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR); determinar, por métodos químicos, espectroscópicos e termogravimétricos, a composição dos extratos otimizados de farelo de soja; avaliar os extratos otimizados quanto à estabilidade frente a digestão *in vitro*, capacidade de inibição de adesão de enterobactérias frente a receptores análogos conhecidos e citotoxicidade desses produtos sobre culturas de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium; e realizar análise preliminar do custo de produção de extratos bioativos de farelo de soja.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Farelo de soja (Imcosoy® 46 – Imcopa) foi ressuspenso em água destilada em diferentes concentrações (100 – 500 g·L⁻¹). As suspensões tiveram seu pH ajustado (0,95 – 13,00) com HCl ou NaOH, seguido de submissão a uma pressão relativa de 1 atm, 120°C (tratamento térmico) por diferentes tempos (14,6 – 105,4 min). Após decorridos os tempos, o material foi resubmetido ao tratamento térmico por mais 15 min, seguido de liofilização. O esquema geral de obtenção do extrato de farelo de soja está apresentado na Figura 4.1.

FIGURA 4.1 - FLUXOGRAMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA



NOTA: PPT: Precipitado; SOB: Sobrenadante.
FONTE: O autor (2016).

O extrato aquoso obtido em cada experimento a partir desse processo de extração foi utilizado como variável resposta do Delineamento Experimental. O rendimento desses extratos aquosos foi calculado em relação à massa seca inicial de farelo de soja utilizada (% m/m).

4.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para otimização dos parâmetros da extração e obtenção de extratos com alta capacidade de adesão

a enterobactérias. Aplicou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três fatores (variáveis) independentes (pH: X_1 ; tempo (min): X_2 ; concentração de farelo de soja ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): X_3) em cinco níveis. O delineamento experimental consistiu de oito pontos fatoriais, seis pontos axiais numa distância de $\pm 1,68179$ (nível codificado) do ponto central e seis repetições do ponto central, totalizando 20 experimentos. Como variáveis dependentes ou variáveis respostas foram selecionadas: 1 - Rendimento do extrato (Y_1) (% m/m) e 2 - Capacidade de adesão a enterobactérias (Y_2) (% em relação ao Controle Positivo).

As variáveis independentes foram codificadas de acordo com a seguinte equação (4.1):

$$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i \quad (4.1)$$

onde, x_i é o valor codificado da variável i , X_i é o valor real correspondente da variável i , X_0 é valor do X_i no ponto central e ΔX_i é o incremento de X_i correspondendo a variação de uma unidade de x entre o nível superior e inferior. A escolha dessas variáveis e seus intervalos foram determinados a partir de experimentos preliminares e estudo do processo de extração. O intervalo e os valores dos pontos centrais de cada uma das três variáveis independentes estão apresentados na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADOS NO DCCR

Variáveis Independentes	Símbolos	Níveis codificados ^a				
		-1,68179 (- α)	-1	0	+1	+1,68179 (+ α)
pH	X_1	0,95	3,4	7	10,6	13,0
Tempo (min)	X_2	14,6	33	60	87	105,4
Concentração de Farelo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X_3	98,2	180	300	420	501,8

NOTA: ^a Equações de codificação: $x_1 = (X_1 - 7)/3,6$; $x_2 = (X_2 - 60)/27$; $x_3 = (X_3 - 300)/120$.

FONTE: O autor (2016).

Os dados obtidos a partir do DCCR foram analisados e o comportamento do sistema pode ser descrito pela seguinte equação polinomial de segunda ordem (4.2):

$$Y = \beta_0 + \sum_i^k \beta_i X_i + \sum_i^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i<j}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.2)$$

onde, Y representa a variável dependente ou resposta predita; β_0 é o coeficiente de regressão para intercepto; β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para os efeitos

linear, quadrático e de interação das variáveis, respectivamente; X_i e X_j são os valores das variáveis independentes e k é número de fatores estudados. O modelo avalia o efeito de cada variável independente sobre a resposta, assim a equação polinomial ajustada foi também apresentada na forma de gráficos de superfície e de contorno, no intuito de ilustrar essa relação e deduzir as condições ótimas.

Análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher foram aplicados sobre os dados experimentais para avaliar a significância estatística do modelo, e a qualidade do ajuste do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 . Os pontos centrais foram utilizados para estimar o erro puro do modelo. Teste t de Student foi utilizado para avaliar a significância das estimativas dos coeficientes da regressão. p -Valores menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os programas *Statistica* (versão Trial 12, StatSoft Inc., EUA) e *Design Expert* (versão Trial 9, Stat-Ease Inc., USA) foram aplicados para a análise dos dados e otimização gráfica, respectivamente. Subsequentemente, experimentos adicionais de confirmação foram realizados, com valores das variáveis independentes nas condições ótimas estimadas, objetivando verificar a validade das estimativas pela equação de regressão.

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES PURIFICADAS

4.2.2.1 Métodos Colorimétricos

- a) Dosagem de Açúcares Totais: foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956), descrito anteriormente no item 2.3.3.1.1 (Capítulo 2).
- b) Dosagem de Proteínas: foram realizadas pelo método de Lowry et al. (1951), descrito anteriormente no item 2.3.3.1.2 (Capítulo 2).
- c) Dosagem de Ácidos Urônicos: foram realizadas pelo método do *m*-hidroxibifenil, proposto por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), descrito anteriormente no item 2.3.3.1.3 (Capítulo 2).

4.2.2.2 Métodos Espectroscópicos

a) Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C : os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos conforme item 2.3.3.6.1 (Capítulo 2).

b) Ressonância Magnética Nuclear de estado sólido: Os espectros de ressonância magnética nuclear usando a técnica CP/MAS (Polarização Cruzada sob Rotação de Ângulo Mágico), foram adquiridos conforme item 2.3.3.6.2 (Capítulo 2).

4.2.2.3 Análises Térmicas – Termogravimetria (TG)

Análise termogravimétrica (TG) foi utilizada para avaliação da perda de massa dos compostos presentes nos extratos de farelo de soja em razão do aumento de temperatura. Os ensaios de TG foram realizados em equipamento de análise térmica simultânea, STA 449 F3 – Jupiter (NETZSCH-Gerätebau GmbH). A amostra (aproximadamente 15 mg) foi aquecida em cadinho de alumina (Al_2O_3), entre 25 - 800°C, com taxa constante de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio.

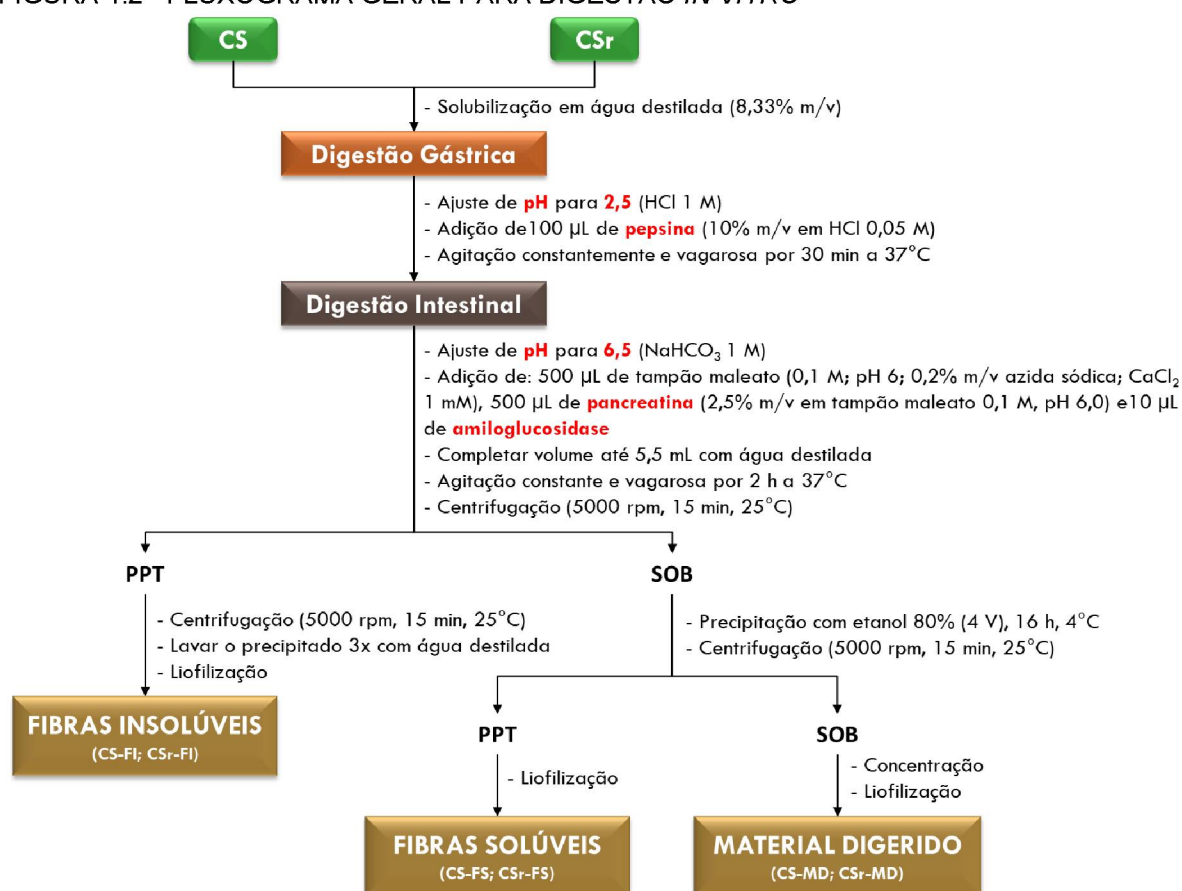
4.2.3 ENSAIOS DE DIGESTÃO *IN VITRO*

As amostras otimizadas (CS e CSr) foram submetidas à digestão *in vitro*, utilizando metodologia proposta por Monro, Mishra e Venn (2010) e adaptada por Carnachan et al. (2012), com o objetivo de avaliar a estabilidade das frações frente a condições similares encontradas num processo de digestão.

Todas as etapas das digestões foram realizadas sob agitação magnética constante e temperatura de 37°C. Após homogeneização das amostras em água destilada (8,33% m/v), o pH de cada solução foi ajustado para 2,5 pela adição de HCl 1 M. Posteriormente, 100 μL de uma solução de pepsina (Cód.: P-7000; Sigma-Aldrich, 10% m/v em HCl 50 mM) foram adicionados, seguido de agitação vagarosa por 30 min, completando a fase gástrica. A fase ileal foi iniciada pela neutralização das soluções com Bicarbonato de Sódio 1 M até pH 6,5, seguida da adição de 500 μL tampão maleato (0,1 M, pH 6,0 acrescido de 0,2% m/v de Azida Sódica e Cloreto de Cálcio 1 mM), 500 μL de solução de pancreatina (Cód.: P-7545; Sigma-Aldrich, 2,5% m/v em tampão maleato pH 6) e 500 μL de amiloglicosidase (obtida de

Aspergillus niger, Megazyme, Cód.: E-AMGDF). As soluções foram completadas com água destilada até volume de 5,5 mL, e permaneceram sob agitação vagarosa por mais 120 min. Ao final, as soluções foram centrifugadas (5000 rpm, 15 min, 25°C), e os precipitados lavados 3x com 30 mL de água destilada. Após, os precipitados foram congelados e liofilizados originando as frações FI. Aos sobrenadantes adicionou-se 4 volumes de etanol (80% v/v; 4°C, 16h). Após centrifugação (5000 rpm, 15 min, 5°C), os precipitados foram ressuspensos em água e liofilizados, originando as frações FS. Os sobrenadantes após terem seus volumes reduzidos por coevaporação foram também ressuspensos em água e liofilizados, originando as frações MD. Todas as frações obtidas foram testadas quanto à sua capacidade de adesão a enterobactérias. Amido, celulose microcristalina (Avicel® PH 101; FMC BioPolymer) e pectina de maçã (Cód.: 76282; Sigma-Aldrich) foram utilizados como controles da reação. O esquema geral do ensaio de digestão *in vitro* é apresentado na Figura 4.2.

FIGURA 4.2 - FLUXOGRAMA GERAL PARA DIGESTÃO *IN VITRO*



NOTA: PPT: Precipitado; SOB: Sobrenadante.

FONTE: O autor (2016).

4.2.4 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADESÃO E INIBIÇÃO DA ADESÃO A ENTEROBACTÉRIAS *IN VITRO*

4.2.4.1 Inóculo e Condições de Cultura

Os testes foram realizados com a enterobactéria *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028. As culturas foram crescidas e mantidas conforme metodologia descrita no item 3.2.2.3 do Capítulo 3.

4.2.4.2 Curva de Calibração

A curva de calibração (regressão linear) foi compilada conforme metodologia descrita previamente no item 3.2.2.4 do Capítulo 3.

4.2.4.3 Parâmetros de Crescimento

Os parâmetros de crescimento foram determinados usando o modelo de cinética bacteriana (Equação 3.2) previamente descrito no item 3.2.2.2 do Capítulo 3. Adicionalmente, foi determinado o tempo $t_{OD=0,1}$ (Equação 3.5 – Capítulo 3), representando o tempo de detecção para se atingir a densidade óptica (OD) de 0,1 em 690 nm. O tempo $t_{OD=0,1}$ obtido foi avaliado em relação à quantidade de bactérias ligadas por meio de uma curva de calibração.

4.2.4.4 Ensaio de Capacidade de Adesão

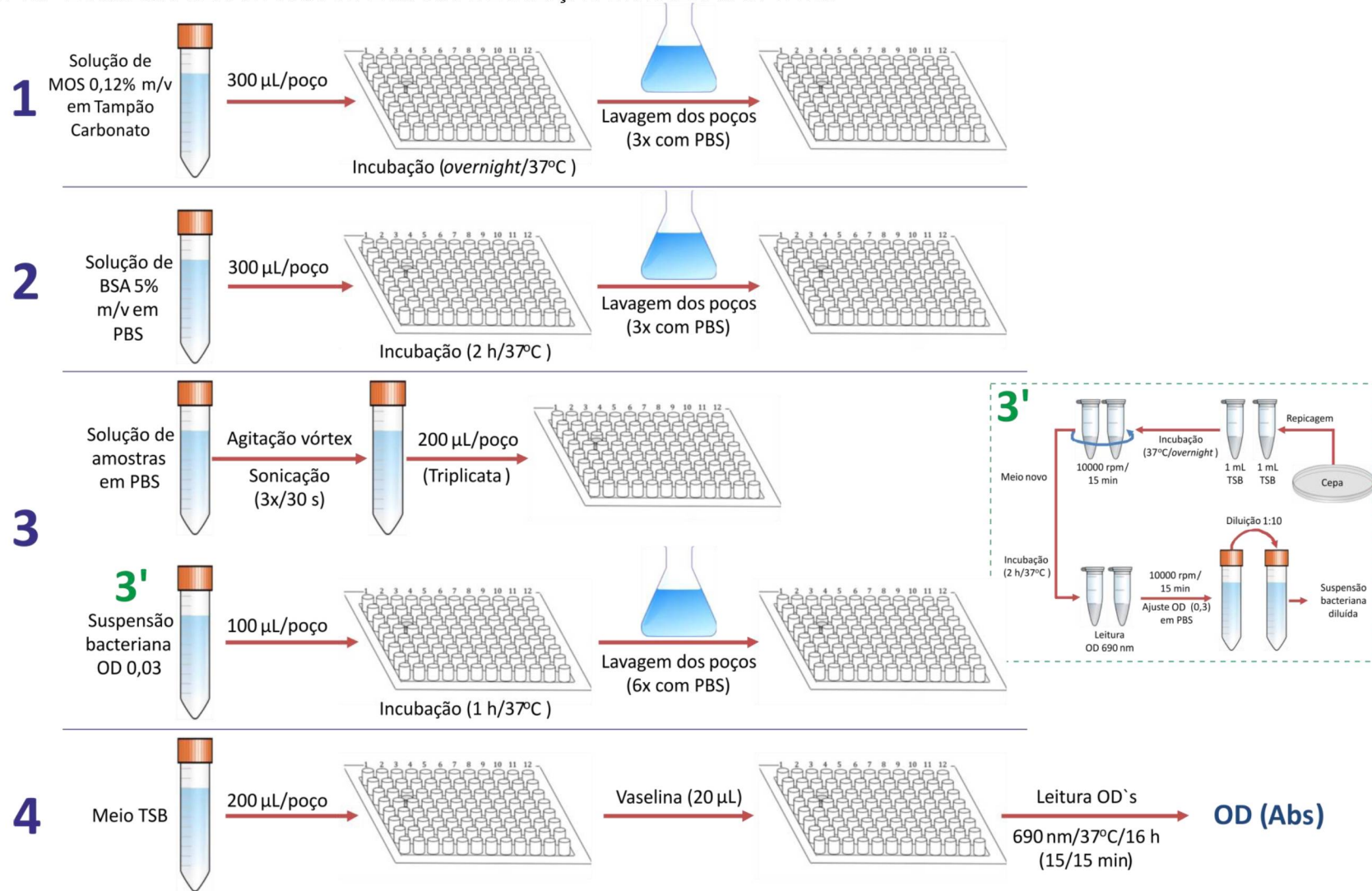
Bactérias foram incubadas em microplacas, cujos micropoços foram previamente revestidos com as amostras em estudo, em concentrações de 0,06-1% (m/v), num ensaio de adesão, adaptando um método descrito por Becker et al. (2007) e Ganner et al. (2010) e descrito em detalhes no item 3.2.2.5 do Capítulo 3.

4.2.5.5 Ensaio de Inibição de Adesão Utilizando Microplacas Revestidas Previamente com Mananas

Para avaliar se o efeito putativo das amostras testadas como ligantes às adesinas em solução é diferente de seus efeitos como ligantes imobilizados à microplaca, soluções com as amostras inibidoras foram usadas como interferentes da adesão bacteriana numa microplaca previamente revestida com mananas, adaptando um método previamente descrito por Fessele e Lindhorst (2013), Becker et al. (2007) e Ganner et al. (2010).

Mananas derivadas de *Saccharomyces cerevisiae* (BioMos® - Alltech) em concentração de 0,12% (m/v) foram dissolvidas em tampão carbonato (Carbonato de Sódio: 15 mM.L⁻¹; Bicarbonato de Sódio: 30 mM.L⁻¹; pH 9,2), agitadas em vórtex e homogeneizadas em banho de ultrassom por 30 s por três vezes. Em seguida 300 µL dessa solução foram transferidas aos poços de uma placa de poliestireno de alta aderência. Após incubação a 37°C durante 16-18 h, a placa foi lavada três vezes com 300 µL de PBS (Fosfato de Sódio 10 mmol.L⁻¹; NaCl 0,15 mol.L⁻¹; pH 7,0), por poço para remoção do material não ligado. Após lavagem, os poços foram bloqueados com 300 µL de BSA 5% (m/v), 37°C, durante 2 h, seguido de lavagem com 300 µL de PBS por três vezes. Soluções das amostras em concentrações de 0,125-1% (m/v) foram dissolvidas em PBS, agitadas em vórtex e homogeneizadas em banho de ultrassom por 30 s por três vezes. Em seguida 200 µL/poço dessas soluções foram transferidas em triplicata para a placa previamente revestida com mananas. Após, 100 µL/poço de uma suspensão bacteriana (OD₆₉₀ 0,03) foram adicionados à microplaca. A microplaca foi então incubada por 1 h a 37°C sob agitação. Após lavagem por seis vezes com 300 µL de PBS, foi adicionado 200 µL de meio TSB e uma gota de óleo de parafina. Assim a placa foi incubada em leitor de microplacas (SpectraMax 340; Molecular Devices Ltd) a 37°C com leituras a cada 15 min a 690 nm, por 16 h. Todas as leituras foram realizadas em três ensaios independentes e em triplicata por ensaio. A placa foi automaticamente agitada sob intensidade média por 3 s antes de cada leitura. O esquema geral do ensaio de inibição da adesão é apresentado na Figura 4.3.

FIGURA 4.3 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ADESÃO *IN VITRO*



NOTA: 1) Bloqueio da placa com MOS; 2) Bloqueio dos espaços não ocupados e prevenção de ligações inespecíficas com BSA; 3) Incubação das amostras e bactérias; 3') Preparo da suspensão bacteriana a ser incubada; 4) Adição de meio e leitura das densidades ópticas.

FONTE: O autor (2016).

Controle de crescimento, controle negativo, controle do meio e branco das amostras foram também avaliados em cada ensaio. O controle de crescimento consistiu em poços previamente bloqueados com BSA, contendo uma suspensão bacteriana em meio TSB com OD 0,03. O controle negativo consistiu em poços contendo apenas o revestimento com mananas, BSA e bactéria sem adicionar o produto a ser testado. Os brancos das amostras consistiram em poços previamente revestidos com mananas e bloqueados com BSA, contendo o produto a ser testado sem adição de bactérias.

4.2.5.6 Tratamento dos Dados e Estatística

Os dados obtidos pelo programa da leitora de microplacas foram convertidos em arquivos de texto e analisados utilizando o Programa R (versão 2.15.1; *The R Foundation for Statistical Computing*). Todos os dados de OD foram processados pela regressão não linear, aplicando a Equação 3.1, dada anteriormente. Os parâmetros então obtidos foram usados para calcular $t_{OD=0,1}$ usando a Equação 3.5. Os valores de $t_{OD=0,1}$, determinados para cada amostra foram transformados em número de UFC por meio da regressão linear obtida a partir da curva de calibração (Item 3.2.2.4), obtendo-se então o número de bactérias inicialmente ligadas às amostras testadas.

Para os ensaios de capacidade de adesão, todas as amostras foram comparadas ao Controle Positivo, estabelecendo o número de bactérias ligadas ao controle como 100%. Esses valores relativos ao controle positivo foram utilizados para o Planejamento Experimental.

Para os ensaios de inibição da adesão, o percentual de inibição foi calculado como (Equação 4.3):

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ UFC sem inibidor} - \text{n}^\circ \text{ UFC com inibidor}}{\text{n}^\circ \text{ UFC sem inibidor}} \right) \times 100 \quad (4.3)$$

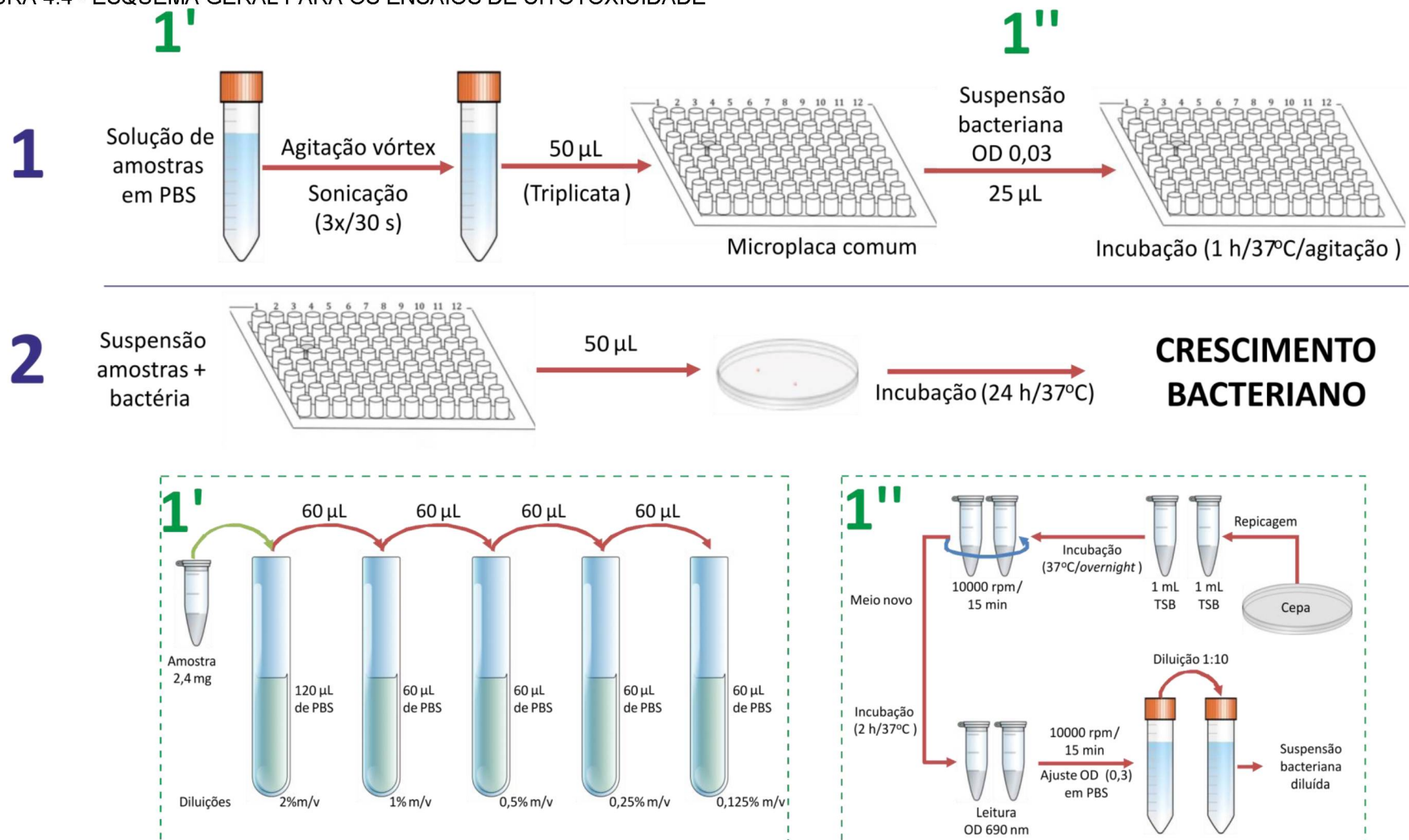
Todos os parâmetros, de ambos os ensaios, foram avaliados estatisticamente aplicando análise de variância (ANOVA). Diferenças entre médias foram determinadas usando teste de Tukey. Dados com p valor menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os gráficos foram gerados

utilizando o software GraphPad Prism 5 (versão 5.03, GraphPad Software Inc, 2010, San Diego, USA).

4.2.5.7 Ensaios de citotoxicidade

Para avaliar se os efeitos inibidores das amostras testadas são decorrentes de uma ligação às bactérias ou então, causadas por efeitos citotóxicos das amostras sobre os microorganismos, soluções das amostras em concentrações de 0,125-2% (m/v) foram dissolvidas em PBS (Fosfato de Sódio 10 mmol.L⁻¹; NaCl 0,15 mol.L⁻¹; pH 7,0), agitadas em vórtex e homogeneizadas em banho de ultrassom por 30 s por três vezes. Em seguida, 50 µL dessas soluções foram transferidas em triplicata aos poços de uma microplaca comum e adicionadas de 25 µL de uma suspensão bacteriana (OD₆₉₀ 0,03). As suspensões resultantes foram incubadas por 1 h, a 37°C sob agitação. Após esse período, 50 µL de cada suspensão foram transferidas para placas contendo Ágar TSB e incubadas por 24 h. Crescimento bacteriano foi determinado visualmente (FESSELE; LINDHORST, 2013). O esquema geral do ensaio de citotoxicidade é apresentado na Figura 4.4.

FIGURA 4.4 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE



NOTA: 1) Pré-incubação das amostras e bactérias; 1') Preparo das soluções de amostras; 1'') Preparo da suspensão bacteriana a ser incubada; 2) Plaqueamento das suspensões de amostras + bactérias em Ágar TSB para posterior análise visual de crescimento.

FONTE: O autor (2016).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do pH (X_1), tempo (min) (X_2) e concentração do farelo de soja ($g \cdot L^{-1}$) (X_3) sobre as variáveis respostas, rendimento dos extratos (Y_1) e capacidade de adesão dos extratos a enterobactérias (Y_2), foram investigados. A matriz do delineamento e os resultados correspondentes aos 20 ensaios utilizando o DCCR estão apresentados na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 - MATRIZ DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESPOSTAS OBSERVADAS DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES

Ensaio ^a	Variáveis Independentes - Valores Codificados			Variáveis Independentes - Valores Reais			Variáveis Dependentes	
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	Rendimento do Extrato ^b (%)	Capacidade de Adesão ^c (%)
1	-1	-1	-1	3,4	33	180	37,7	139,7
2	-1	-1	1	3,4	33	420	31,1	98,7
3	-1	1	-1	3,4	87	180	38,0	100,0
4	-1	1	1	3,4	87	420	39,2	82,6
5	1	-1	-1	10,6	33	180	40,0	72,7
6	1	-1	1	10,6	33	420	44,7	98,1
7	1	1	-1	10,6	87	180	49,9	141,9
8	1	1	1	10,6	87	420	40,5	159,3
9	-1,68179	0	0	0,95	60	300	55,5	188,1
10	1,68179	0	0	13,0	60	300	76,8	209,8
11	0	-1,68179	0	7,0	14,6	300	26,0	41,2
12	0	1,68179	0	7,0	105,4	300	34,9	68,1
13	0	0	-1,68179	7,0	60	98,2	30,7	51,9
14	0	0	1,68179	7,0	60	501,8	28,2	57,0
15 (C)	0	0	0	7,0	60	300	32,1	54,4
16 (C)	0	0	0	7,0	60	300	30,7	54,4
17 (C)	0	0	0	7,0	60	300	28,0	50,8
18 (C)	0	0	0	7,0	60	300	31,1	49,7
19 (C)	0	0	0	7,0	60	300	28,0	47,4
20 (C)	0	0	0	7,0	60	300	31,4	45,7

NOTA: ^a Número dos ensaios não correspondem a ordem de execução dos experimentos; ^b Rendimento em percentagem do extrato aquoso em relação ao farelo de soja inicial (% m/m); ^c Considerando como 100% o n° de UFC encontrado para o Controle Positivo (Produto comercial BioMos®). X_1 : pH; X_2 : tempo (min); X_3 : concentração do farelo de soja ($g \cdot L^{-1}$).

FONTE: O autor (2016).

As condições utilizadas nesse estudo para o processo resultaram em rendimento da extração (Y_1) variando entre 26 – 76,8% (m/m), e extratos com capacidade de adesão a enterobactérias (Y_2) variando entre 41,2 – 209,8% quando comparados ao produto comercial. Os pontos centrais para ambas as respostas apresentaram uma variação pequena, indicando boa reprodutibilidade do processo. Os melhores resultados para rendimento da extração ($Y_1 = 76,8$ e 55,5%) e capacidade de adesão ($Y_2 = 209,8$ e 188,1%) foram obtidos no maior e menor valor de pH testado (13,0 e 0,95, respectivamente), em intervalo de tempo e concentração no nível 0 (60 min e 300 g·L⁻¹). Outras condições, também apresentaram resultados satisfatórios, dessa forma, uma otimização envolvendo ambas as respostas, foi realizada para selecionar a melhor condição global para este processo.

4.3.1 EFEITO DO pH, TEMPO E CONCENTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA SOBRE O RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

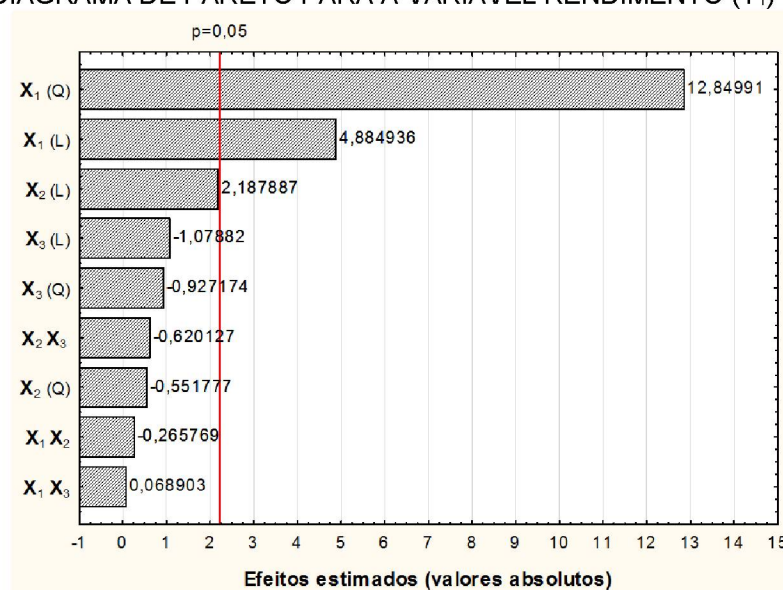
Os efeitos principais e suas respectivas interações, em função do rendimento da extração (Y_1), estão descritos na Tabela 4.3. Os valores de p menores que 0,05, indicam efeitos estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95%. Assim, é possível observar, que apenas a variável pH (X_1), em termos linear (L) e quadrático (Q), apresentaram efeitos significativos. A variável tempo (X_2), em termo linear, apresentou um valor de $p = 0,0535$, indicando um valor no limite de significância. A variável concentração do farelo de soja (X_3), demais termos quadráticos e interações, não foram significativas. Esses resultados sugerem que a mudança no pH e tempo de extração apresentam efeito significativo sobre o rendimento, no entanto não há efeito de interação entre esses parâmetros. A confirmação desses dados é representada pelo Diagrama de Pareto (Gráfico 4.1).

TABELA 4.3 - ANÁLISE DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1)

Fatores	Coeficiente	Erro Padrão	$t_{\text{calc}} (10)$	p -valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	30,3341	1,46391	20,7213	<0,0001*	27,0723	33,5959
X_1	9,5312	1,95113	4,8849	0,0006*	5,1838	13,8785
X_1^2	24,6457	1,91797	12,8499	<0,0001*	20,3722	28,9192
X_2	4,2688	1,95113	2,1879	0,0535	-0,0785	8,6162
X_2^2	-1,0583	1,91797	-0,5518	0,5932	-5,3318	3,2152
X_3	-2,1049	1,95113	-1,0788	0,3060	-6,4523	2,2425
X_3^2	-1,7783	1,91797	-0,9272	0,3757	-6,0518	2,4952
$X_1 X_2$	-0,6750	2,53980	-0,2658	0,7958	-6,3340	4,9840
$X_1 X_3$	0,1750	2,53980	0,0689	0,9464	-5,4840	5,8340
$X_2 X_3$	-1,5750	2,53980	-0,6201	0,5490	-7,2340	4,0840

NOTA: * Significativo ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

GRÁFICO 4.1 - DIAGRAMA DE PARETO PARA A VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1)

FONTE: O autor (2016).

O Diagrama de Pareto representa o nível de confiança (95%) por uma linha vermelha, correspondente ao valor de $p = 0,05$. A sequência das barras é apresentada de modo decrescente e fornece os resultados dos efeitos das variáveis. As variáveis que apresentaram valores positivos indicam que o aumento de seus níveis proporciona um maior rendimento em massa, e os valores negativos de forma inversa. Dessa forma, confirma-se que a variável pH (efeito linear e efeito quadrático) apresentou efeitos estatisticamente significativos, dentro da faixa de

níveis experimentais estudada, extrapolando a linha de referência correspondente ao intervalo de confiança de 95%. A variável tempo (efeito linear) apresentou efeito sob o limite de confiança, recomendando-se, dessa forma, ser analisada posteriormente com cautela. O pH (efeito quadrático) se destaca como a variável de maior significância seguido da mesma variável em efeito linear. A interação entre as variáveis pH x concentração do farelo (X_1 X_3), dentre as variáveis e níveis estudados foi o parâmetro que menos apresentou significância. É possível observar também que a variável concentração (X_3), tanto sob termo linear ou quadrático, apresentou efeito negativo sobre a resposta.

Extrações sólido-líquido são operações heterogêneas, envolvendo transferência de massa entre a matriz sólida e o solvente utilizado. Seu equilíbrio é dependente das condições aplicadas ao sistema como: temperatura, tempo de extração, pH, características da matriz (p.e. viscosidade, tamanho das partículas, porosidade, densidade, etc) e gradientes solvente/matriz (DUTTA, 2007; CONDE et al., 2010). Os resultados obtidos pelo planejamento experimental em estudo demonstram que o excesso de farelo de soja acarreta saturação do sistema, impossibilitando a dissolução total do material. Dessa forma, o acesso do solvente à matriz polimérica fica dificultado resultando em menor transferência de massa entre o farelo e o meio. Assim, concentrações mais baixas de farelo favoreceriam a extração de biomoléculas, em razão de maior interação entre solvente e matriz de extração.

Os coeficientes de regressão dos fatores e suas interações são observados na Tabela 4.4. A análise de variância da regressão, indica apenas contribuição significativa da variável pH sobre o rendimento da extração ($p < 0,05$).

TABELA 4.4 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL COMPLETO - VARIÁVEL RENDIMENTO DO EXTRATO (Y_1)

Fatores	Coefficiente	Erro Padrão	$t_{\text{calc}} (10)$	p -valor
Média	51,9686	14,0022	3,7114	0,0040*
X_1	-11,8404	1,59336	-7,4311	<0,0001*
X_1^2	0,9508	0,0740	12,8499	<0,0001*
X_2	0,2634	0,2200	1,197	0,2589
X_2^2	-0,0007	0,0013	-0,5518	0,5932
X_3	0,0414	0,0514	0,8067	0,4386
X_3^2	-0,0001	0,0001	-0,9272	0,3757
$X_1 X_2$	-0,0035	0,0131	-0,2658	0,7958
$X_1 X_3$	0,0002	0,0029	0,0689	0,9464
$X_2 X_3$	-0,0002	0,0004	-0,6201	0,5490

NOTA: * Significativo ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

Com base nos resultados apresentados, o modelo quadrático foi simplificado e as análises de ANOVA foram refeitas, excluindo os fatores com pequena ou nenhuma influência sobre o resultado do ajuste final. Com isso tem-se um modelo com menor número de fatores, o qual denomina-se modelo reparametrizado ou modelo reduzido. Assim, o modelo polinomial reparametrizado de segunda ordem representando o rendimento da extração (Y_1) como uma função simultânea do pH, tempo e concentração, é descrito pela Equação 4.4:

$$Y_1(\%) = 62,3213 - 12,1157X_1 + 0,96X_1^2 + 0,0791X_2 \quad (4.4)$$

O modelo de superfície de resposta foi expresso em termos de valores reais para todas as variáveis, ignorando os termos estatisticamente não significativos, porém mantendo a variável tempo, que apresentou efeito considerável sobre a variável resposta. Os resultados da análise de regressão do modelo reparametrizado estão listados na Tabela 4.5.

TABELA 4.5 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL REDUZIDO - VARIÁVEL RENDIMENTO DO EXTRATO (Y_1)

Fatores	Coefficiente	Erro Padrão	$t_{\text{calc}} (16)$	p -valor
Média	62,3213	3,745035	16,6410	<0,0001*
X_1	-12,1157	0,947345	-12,7891	<0,0001*
X_1^2	0,9600	0,065432	14,6710	0,0001*
X_2	0,0791	0,032196	2,4554	0,0259*

NOTA: * Significativo ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

Os resultados de Teste F para a ANOVA, descritos na Tabela 4.6, demonstram que esta regressão é estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em intervalo de confiança de 99%, indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos (Gráfico 4.2). O coeficiente de determinação R^2 designa uma medida de proporção da variabilidade nas respostas observadas explicada pelas variáveis independentes e suas correlações (VOHRA; SATYANARAYANA, 2002). O coeficiente de determinação do modelo (R^2) de 0,94 demonstra uma boa correlação entre as variáveis independentes, sugerindo que o modelo ajustado pode explicar 94% da variação total das respostas. Para que uma regressão possa ser considerada significativa, não apenas estatisticamente, mas também útil para fins preditivos é necessário que a falta de ajuste seja não significativa, refletindo apenas os erros aleatórios (PIMENTEL; NETO, 1996). A análise da falta de ajuste é dada entre o erro puro, proveniente dos resultados das condições dos pontos centrais e a falta de ajuste dos dados ao modelo. O p -valor de 0,06 para a falta de ajuste indica que o modelo pode ser considerado satisfatório.

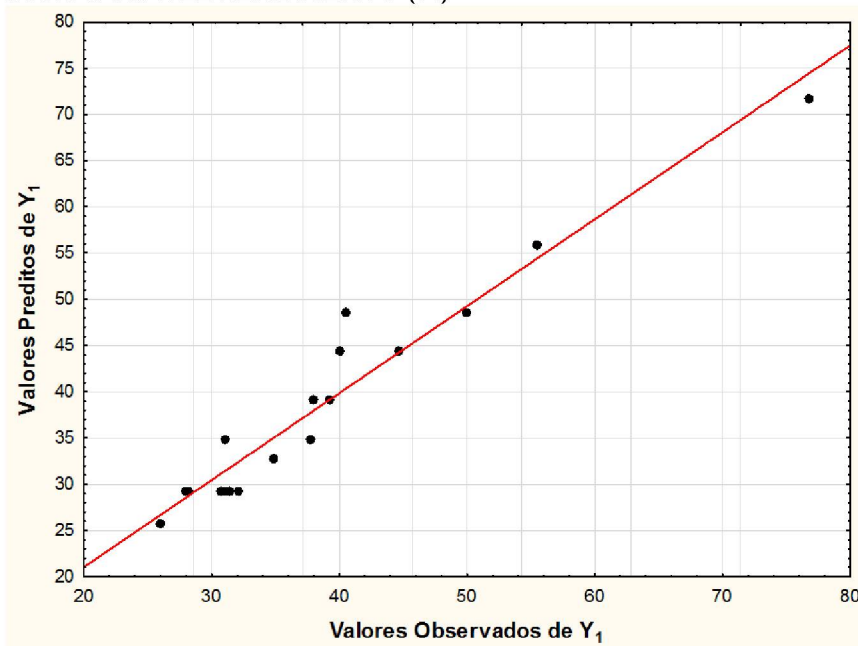
TABELA 4.6 - ANOVA PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL REDUZIDO - VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1)

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calc}	F_{tab}	p -valor
Modelo	2574,38	3	858,13	83,77	3,24	<0,0001*
X_1	307,856	1	307,856	30,05		<0,0001*
X_1^2	2204,772	1	2204,772	215,24		<0,0001*
X_2	61,756	1	61,756	6,03		0,0259*
Residual	163,894	16	10,243			
Falta de Ajuste	148,105	11	13,464	4,26	4,70	0,0608
Erro Puro	15,788	5	3,158			
Total SS	2738,277	19				

NOTA: % de variação explicada pelo modelo = 94,01% ($R^2 = 0,94$).

FONTE: O autor (2016).

GRÁFICO 4.2 - VALORES EXPERIMENTAIS OBSERVADOS EM FUNÇÃO DOS VALORES PREDITOS PARA A VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1)



FONTE: O autor (2016).

A partir do modelo gerado pela Equação 4.4 e seus respectivos coeficientes de regressão apresentados na Tabela 4.6, foram geradas superfícies de respostas 3D e curvas de contorno 2D, para verificar as regiões com melhores condições experimentais. Uma curva de contorno 2D mostra as linhas de isoresposta como função dos níveis de duas variáveis, enquanto as superfícies de resposta 3D representam a resposta sobre uma terceira dimensão, como função dos níveis de duas variáveis (MONTES et al., 2009).

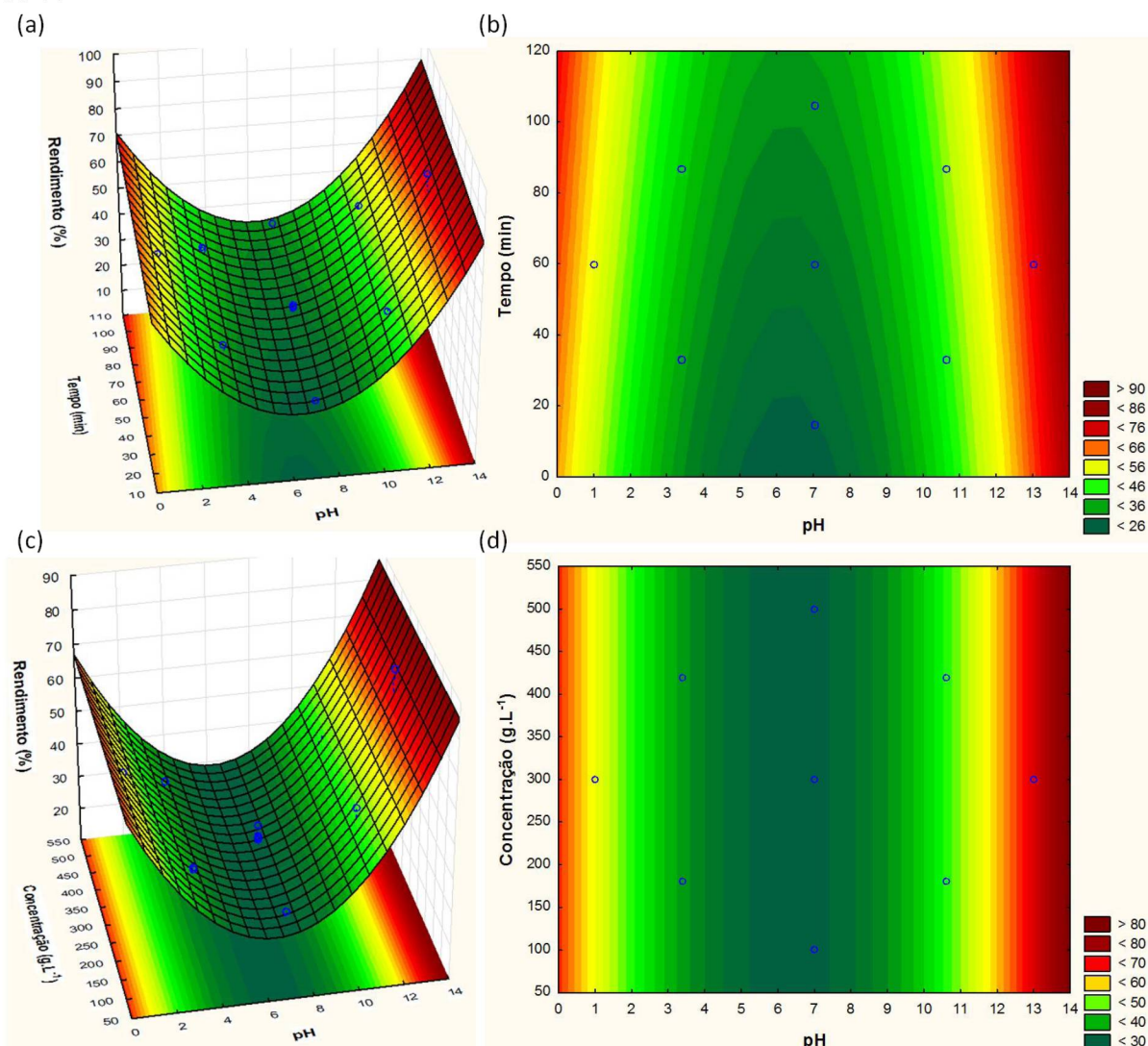
A Figura 4.5 apresenta as superfícies de resposta e curvas de contorno para a variável resposta em questão. Como nesse estudo três variáveis estão sendo analisadas, para geração das superfícies de respostas, uma variável foi fixada em seu nível 0. O rendimento do processo (Y_1) foi afetado principalmente pela variável pH (X_1). Valores de pH $<2,0$ e $>11,0$ aumentam evidentemente o rendimento do processo, atingindo valores superiores a 60%. O aumento do tempo (X_2), sob pH extremo, concentração do farelo (X_3) fixada no nível 0 ($300 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), promoveu um ligeiro aumento no rendimento (Figura 4.5a e b), no entanto observa-se que tempos intermediários geraram rendimentos satisfatórios, possibilitando a otimização do processo de produção, uma vez que é possível a diminuição do tempo total e custos. Quando o tempo é fixado no nível 0 (60 min), valores extremos de pH resultaram em maiores rendimentos, independente da concentração de soluto utilizada (Figura 4.5c

e d), o que era previsível uma vez que a variável X_3 não se mostrou estatisticamente significativa.

O aumento do rendimento do extrato em condições extremas de pH pode ser interpretado como resultado do aumento na solubilidade de proteínas ou seus agregados. As frações proteicas de soja são estruturas complexas, constituídas principalmente por proteínas do tipo globulinas, insolúveis em água no seu ponto isoelétrico (pI) (WOLF, 1970). O pI é o pH característico no qual a carga total líquida é igual a zero. Dessa forma, à medida que o pH se aproxima do pI, a agregação das proteínas resulta na precipitação devido à interação entre as moléculas em função da ausência de repulsão eletrostática. Yuan et al., (2002) estudaram a solubilidade da glicinina e a β -conglucina, as duas principais proteínas de armazenamento da soja, sendo as regiões de menor solubilidade em pH $<3,5$ e $>7,0$. Os resultados obtidos pelo DCCR, para a resposta rendimento (Y_1), são semelhantes, sendo possível observar pelos modelos de superfície resultantes (Figura 4.5) que a região de menor rendimento se encontra entre pH 5 – 7,5.

Jiang, Chen e Xiong (2009) e Jiang, Xiong e Chen (2010) estudaram o comportamento de isolado proteico de soja (SPI), glicinina e β -conglucina quando expostas a pH 1,5 e 12,0 sob diferentes tempos, seguido de ajuste para pH 7,0, condições semelhantes às aplicadas nesse estudo. Os resultados mostraram que esse tipo de tratamento induziu dissociação e desagregação das proteínas, gerando alterações conformacionais que melhoraram a solubilidade dessas moléculas. Entre essas alterações destaca-se a clivagem de ligações dissulfeto entre unidades de glicinina, resultando em desestabilização da estrutura nativa, facilitando a repulsão interpeptídica. Os pesquisadores demonstraram ainda que a força iônica também afeta a solubilidade das proteínas de soja e agregados solúveis. As interações eletrostáticas, que ocasionaram a precipitação de proteínas, foram enfraquecidas frente a presença de NaCl. O processo de extração realizado para o farelo de soja neste estudo gera grandes quantidades de NaCl, formadas durante a etapa de neutralização (após a primeira etapa de tratamento térmico). Esse NaCl formado pode estar atuando como agente protetor das proteínas durante a segunda etapa de tratamento térmico.

FIGURA 4.5 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTOURO PARA A VARIÁVEL RENDIMENTO (Y_1) EM FUNÇÃO DO PH E TEMPO (a),(b) E PH E CONCENTRAÇÃO DO SOLUTO (c),(d)



FONTE: O autor (2016).

Todos os ensaios do planejamento experimental foram realizados em temperatura elevada ($120^{\circ}C$). É conhecido que tratamentos térmicos podem alterar a estrutura das proteínas expondo grupos reativos, provocando o aumento da hidrofobicidade da proteína (WANG et al., 2014) e gerando agregados insolúveis (TANG; CHOI; MA, 2007). Guo et al. (2012) avaliaram as interações entre glicina e β -conglucina, concluindo que durante o tratamento térmico existe formação de copolímeros solúveis decorrentes da alta afinidade da unidade β da conglucina para as subunidades básicas de glicina. Tratamentos térmicos curtos ocasionam desnaturação das proteínas gerando agregados que precipitam e diminuem a solubilidade do sistema (SORGENTINI; WAGNER; ANON, 1995; WAGNER;

SORGENTINI; ANON, 2000). No entanto, as frações insolúveis são gradualmente convertidas em agregados solúveis com o aumento do tempo de aquecimento (KINSELLA, 1979; GUO et al., 2015). Atribui-se o efeito de solubilização à quebra das interações não covalentes e/ou ligações dissulfeto dentro desses agregados (LI et al., 2007; ZHENG et al., 2008). Os dados obtidos nesse planejamento corroboram com estas informações, visto que, a maioria dos ensaios nos menores tempos, quando comparados às mesmas condições de pH e concentração em tempos maiores, resultaram em rendimentos inferiores.

O pH, fator mais significativo para o modelo obtido, pode favorecer também a extração de carboidratos, resultando assim no aumento do rendimento das frações solúveis. Vários trabalhos demonstram a extração de polissacarídeos de soja em pHs ácidos e alcalinos. As extrações ácidas foram conduzidas em $\text{pH} < 6$, temperatura elevada e/ou sob pressão (YAMAGUCHI et al., 1994; FURUTA et al., 1996; NOGUCHI; SHIKANUMA, 1996; YAMAGUCHI; OTA; HATANAKA, 1996; FURUTA, TAKAHASHI; TOBE; KIWATA, et al., 1998; FURUTA; TAKAHASHI; TOBE; MOMEN, 1998; HUA et al., 2010; QI, 2010; TU et al., 2010; NAKAMURA et al., 2012; NOSEDA et al., 2012; RODRIGUES, 2012; FASOLIN, 2013; CHIVERO et al., 2014; XIONG et al., 2015). As extrações alcalinas foram conduzidas em $\text{pH} > 10$, também em temperaturas elevadas e/ou sob pressão (MORITA, 1965; LABAVITCH; FREEMAN; ALBERSHEIM, 1976; NAKAO; MIYASHITA; TODA, 1978; JATOBÁ, 1996; MA, 2006).

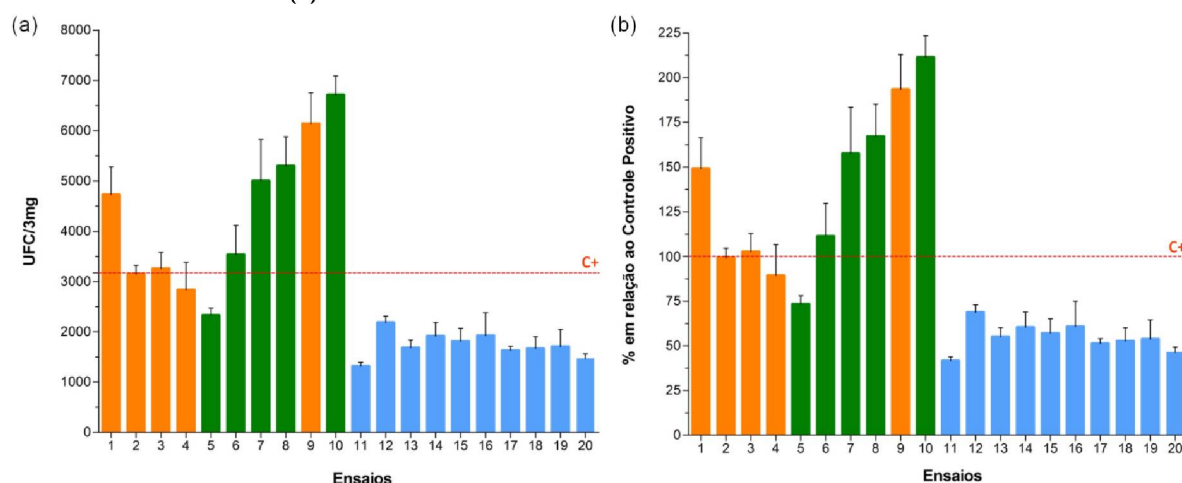
4.3.2 EFEITO DO pH, TEMPO E CONCENTRAÇÃO DO FARELO DE SOJA SOBRE A CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS

Dando continuidade ao trabalho foi avaliado o efeito das variáveis independentes (pH, tempo e concentração) sobre a variável resposta Capacidade de adesão (Y_2). A partir da equação sigmoïdal (Equação 3.1) foram obtidos valores respectivos aos tempos necessários para que a densidade óptica da suspensão em 690 nm atinja um valor igual a 0,1 ($t_{OD=0,1}(h)$). Esses tempos foram aplicados numa regressão linear, compilada plotando-se o número de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ em função do $t_{OD=0,1}$ de diluições seriadas de uma cultura de *Salmonella* spp. (Regressão linear $y = -0,7693x + 8,0481$ ($R^2 = 0,996$)). Esta regressão foi usada para calcular a quantidade desconhecida de bactérias ligadas aos extratos de farelo de soja (Figura

4.6a). Quanto mais bactérias inicialmente ligadas, mais rápido o crescimento e menor será o tempo necessário para atingir uma OD 0,1, indicando assim, uma alta capacidade de adesão das amostras testadas.

Objetivando encontrar extratos biotecnologicamente ativos e potencialmente competitivos comercialmente, todas as amostras foram comparadas a um Controle Positivo (C+), que consiste em um produto comercial derivado de *Saccharomyces cerevisiae*. Deste modo, estabelecendo o número de bactérias ligadas ao C+ como 100%, é possível verificar com maior clareza os extratos que se destacaram, sem alterar a grandeza dos resultados (Figura 4.6b). Esses valores relativos ao C+ foram utilizados para o Planejamento Experimental.

FIGURA 4.6 - CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS TESTADOS EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (a) E PERCENTAGEM EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO (b)



NOTA: Dados representam valores médios \pm DP. C+: Controle positivo; Extratos obtidos em pH ácido (■), alcalino (■), e neutro (■).

FONTE: O autor (2016).

É possível observar claramente na Figura 4.6, que os extratos obtidos em condições ácidas e alcalinas se destacam quanto à capacidade de adesão a enterobactérias (Y_2), variando entre 82,6 – 188,1% para as extrações ácidas e 72,7 – 209,8% para as extrações alcalinas. Todos os extratos obtidos em condições de pH neutro apresentaram capacidades de adesão inferiores ao produto comercial, variando entre 45,7 – 68,1%, indicando condições desfavoráveis para extração de moléculas bioativas.

Os efeitos principais e suas respectivas interações, em função da capacidade de adesão dos extratos a enterobactérias (Y_2), estão descritos na Tabela

4.7. Observa-se, que as variáveis pH (X_1), em termos linear (L) e quadrático (Q), tempo (X_2), termo linear e as interações pH x tempo ($X_1 X_2$) e pH x concentração do farelo ($X_1 X_3$) apresentaram efeitos significativos. A variável concentração, demais termos quadráticos e interações, não apresentaram significância nas faixas estudadas. A confirmação desses dados é representada pelo Diagrama de Pareto (Gráfico 4.3).

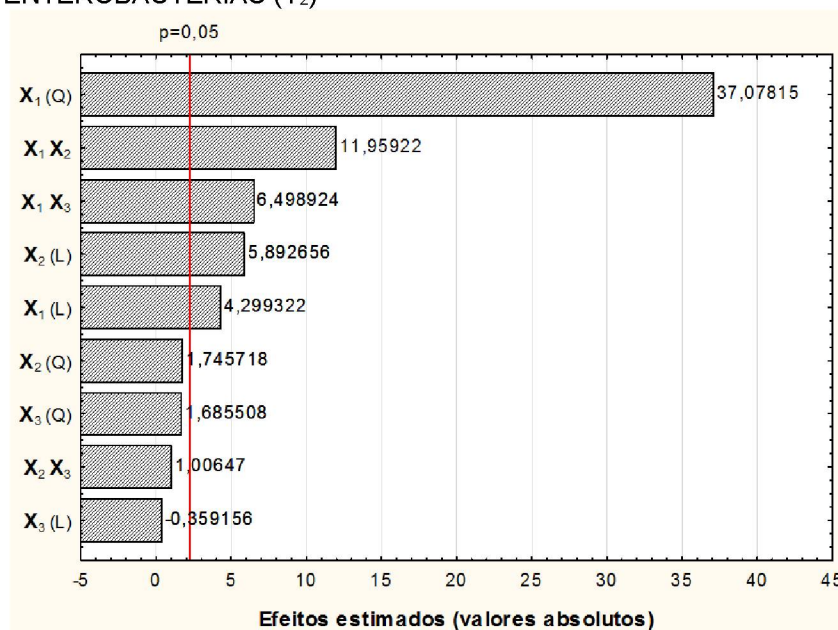
TABELA 4.7 - ANÁLISE DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)

Fatores	Coeficiente	Erro Padrão	t_{calc} (10)	p -valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	50,2184	2,243905	22,37993	<0,0001*	45,2187	55,2182
X_1	12,8581	2,990718	4,29932	0,0016*	6,1943	19,5218
X_1^2	109,0055	2,939884	37,07815	<0,0001*	102,4550	115,5559
X_2	17,6233	2,990718	5,89266	0,0001*	10,9595	24,2870
X_2^2	5,1322	2,939884	1,74572	0,1115	-1,4183	11,6827
X_3	-1,0741	2,990718	-0,35916	0,7269	-7,7379	5,5896
X_3^2	4,9552	2,939884	1,68551	0,1228	-1,5953	11,5057
$X_1 X_2$	46,5577	3,893042	11,95922	<0,0001*	37,8835	55,2320
$X_1 X_3$	25,3006	3,893042	6,49892	0,0001*	16,6263	33,9748
$X_2 X_3$	3,9182	3,893042	1,00647	0,3379	-4,7560	12,5925

NOTA: * Significativo ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

GRÁFICO 4.3 - DIAGRAMA DE PARETO PARA A VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)



FONTE: O autor (2016).

O Diagrama de Pareto confirma que as variáveis pH (termos linear e quadrático), tempo (termo linear) e as interações pH x tempo ($X_1 X_2$) e pH x concentração do farelo ($X_1 X_3$) apresentaram efeitos estatisticamente significativos, dentro da faixa de níveis experimentais estudadas, extrapolando a linha de referência correspondente ao intervalo de confiança de 95%. Novamente o pH (efeito quadrático) se destaca como a variável de maior significância seguido pelo efeito da interação pH x tempo ($X_1 X_2$).

A variável concentração do farelo (X_3), dentre as variáveis e níveis estudados foi o parâmetro que menos apresentou significância e o único que apresentou efeito negativo sobre a resposta em questão (Y_2). Assim como, para o rendimento do extrato (Y_1), o aumento excessivo da concentração do farelo de soja gera saturação do sistema, impedindo a homogeneização total do material e dificultando o acesso do solvente à matriz de extração, podendo resultar na limitação da extração de moléculas bioativas.

Os coeficientes de regressão dos fatores e suas interações são observados na Tabela 4.8. A análise de variância da regressão, indica contribuição significativa das variáveis pH (termos linear e quadrático), tempo e concentração do farelo (termos lineares), e interações pH x tempo ($X_1 X_2$) e pH x concentração do soluto ($X_1 X_3$) sobre a capacidade de adesão dos extratos a enterobactérias ($p < 0,05$).

TABELA 4.8 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL COMPLETO - VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)

Fatores	Coefficiente	Erro Padrão	$t_{\text{calc}} (10)$	p -valor
Média	426,6695	21,4628	19,8795	<0,0001*
X_1	-80,2452	2,4423	-32,8561	<0,0001*
X_1^2	4,2055	0,1134	37,0781	<0,0001*
X_2	-1,9539	0,3373	-5,7933	0,0002*
X_2^2	0,0035	0,0020	1,7457	0,1114
X_3	-0,3490	0,0787	-4,4317	0,0013*
X_3^2	0,0002	0,0001	1,6855	0,1228
$X_1 X_2$	0,2395	0,0200	11,9592	<0,0001*
$X_1 X_3$	0,0293	0,0045	6,4989	0,0001*
$X_2 X_3$	0,0006	0,0006	1,0065	0,3379

NOTA: * Significativo ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

Com base nos resultados apresentados, o modelo quadrático foi simplificado e as análises de ANOVA foram refeitas, mantendo-se apenas os fatores que apresentam influência sobre o resultado do ajuste final. Assim, o modelo matemático reparametrizado descrevendo a capacidade de adesão dos extratos a enterobactérias (Y_2) é expresso pela Equação 4.5:

$$Y_2(\%) = 389,7420 - 79,7909X_1 + 4,1730X_1^2 - 1,3501X_2 - 0,2095X_3 + 0,2395X_1X_2 + 0,0293X_1X_3 \quad (4.5)$$

O modelo de superfície de resposta foi expresso em termos de valores reais para todas as variáveis. Os resultados da análise de regressão estão listados na Tabela 4.9.

TABELA 4.9 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL REDUZIDO - VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)

Fatores	Coefficiente	Erro Padrão	t_{calc} (13)	p -valor
Média	389,7420	16,50345	23,6158	<0,0001*
X_1	-79,7909	2,73527	-29,1712	<0,0001*
X_1^2	4,1730	0,12646	32,9974	<0,0001*
X_2	-1,3501	0,16935	-7,9724	<0,0001*
X_3	-0,2095	0,03810	-5,4971	0,0001*
$X_1 X_2$	0,2395	0,02250	10,6441	<0,0001*
$X_1 X_3$	0,0293	0,00506	5,7843	0,0001*

NOTA: * Significativo ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

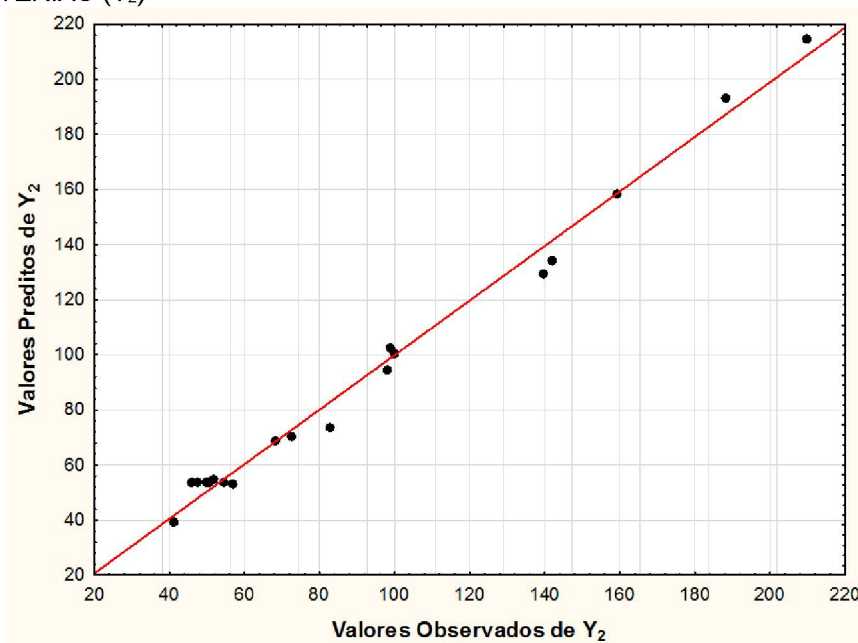
A Tabela 4.10 apresenta os resultados de ajuste do modelo quadrático para os dados obtidos. O valor de F de 212,97, obtido para a ANOVA indica que o modelo é estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) num intervalo de confiança de 99%, demonstrando um ótimo grau de correlação entre os valores observados e previstos (Gráfico 4.4). O coeficiente de determinação do R^2 , calculado em 0,99, indica que 99% da variação total das respostas podem ser explicadas pelo modelo. O p -valor de 0,06 para a falta de ajuste indica que o modelo pode ser considerado satisfatório. Observa-se pelo ANOVA que a variável X_3 não apresenta significância, como já apresentado anteriormente (Gráfico 4.3), porém seu coeficiente de regressão foi significativo (Tabela 4.8) em razão da hierarquia do modelo, uma vez que a interação $X_1 X_3$ apresentou efeito significativo.

TABELA 4.10 - ANOVA PARA O MODELO QUADRÁTICO POLINOMIAL REDUZIDO - VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calc}	F_{tab}	p -valor
Modelo	48895,56	6	8149,26	212,97	2,92	<0,0001*
X_1	560,28	1	560,28	14,642		0,0021*
X_1^2	41663,36	1	41663,36	1088,828		<0,0001*
X_2	1052,52	1	1052,52	27,506		0,0002*
X_3	3,91	1	3,91	0,102		0,7543
$X_1 X_2$	4335,24	1	4335,24	113,297		<0,0001*
$X_1 X_3$	1280,24	1	1280,24	33,458		0,0001*
Residual	497,44	13	38,26			
Falta de Ajuste	433,55	8	54,19	4,241	4,82	0,0641
Erro Puro	63,89	5	12,78			
Total SS	49392,99	19				

NOTA: % de variação explicada pelo modelo = 98,99% ($R^2 = 0,99$).

FONTE: O autor (2016).

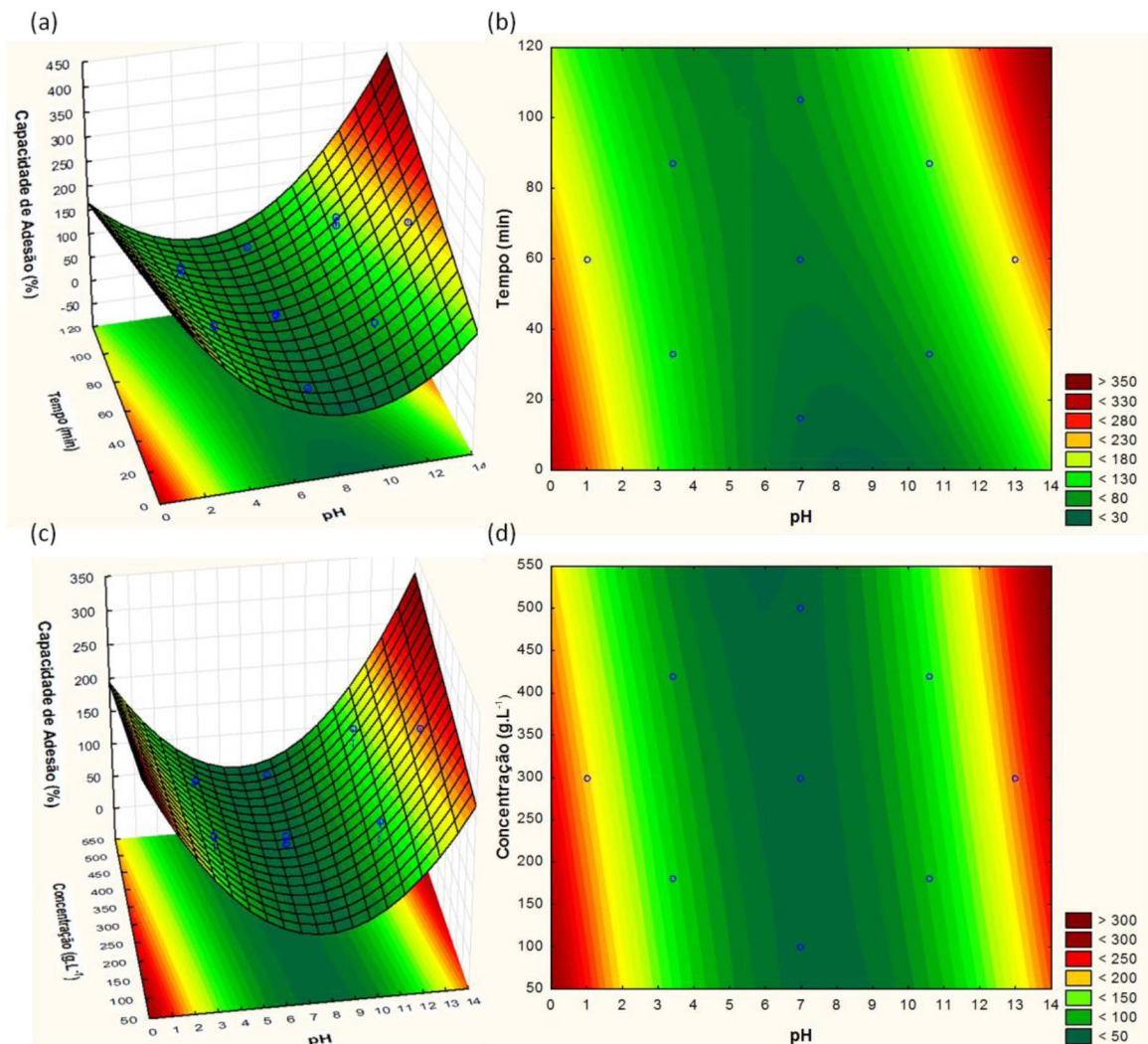
GRÁFICO 4.4 - VALORES EXPERIMENTAIS OBSERVADOS EM FUNÇÃO DOS VALORES PREDITOS PARA A VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)

FONTE: O autor (2016).

As superfícies de respostas para a capacidade de adesão previstas dentro da região experimental investigada são mostradas na Figura 4.7. A capacidade de adesão a enterobactérias (Y_2) foi afetada principalmente pela variável pH (X_1) e suas interações. Valores extremos de pH resultaram em extratos com maior capacidade de adesão a enterobactérias. Para pHs ácidos observa-se que tempos e

concentrações de farelo inferiores à 60 min e 300 g·L⁻¹, respectivamente, forneceram as melhores respostas. Inversamente, para pHs alcalinos, tempos e concentrações de farelo superiores a 60 min e 300 g·L⁻¹, respectivamente, permitiram a obtenção de extratos com maior atividade. Assim, observa-se que, dentre as faixas de estudo pré-estabelecidas, as condições ótimas para extração de compostos com alta taxa de adesão a enterobactérias, foram pH <2,0 e >12,0; tempo de 60 min e concentração de farelo de soja de 300 g·L⁻¹. Esses resultados indicam que as condições estudadas neste planejamento experimental favorecem a extração de moléculas bioativas, capazes de aderir a enterobactérias, com potencial comercial competitivo, uma vez que apresentaram maior atividade que o produto comercial testado.

FIGURA 4.7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTOURNO PARA A VARIÁVEL CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2) EM FUNÇÃO DO PH E TEMPO (a), (b) E PH E CONCENTRAÇÃO (c), (d)

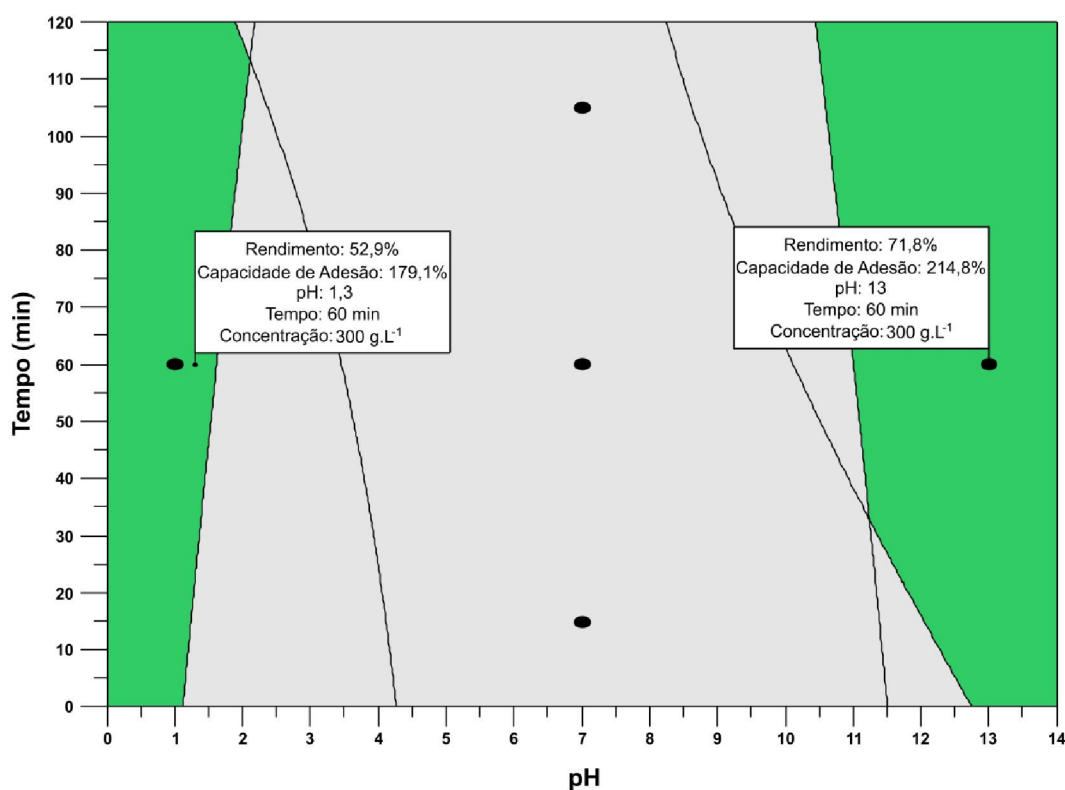


FONTE: O autor (2016).

4.3.3 OTIMIZAÇÃO GRÁFICA E VALIDAÇÃO DOS MODELOS DE REGRESSÃO

Uma otimização gráfica foi conduzida sobrepondo os gráficos de contorno obtidos para as duas variáveis respostas: rendimento da extração (Y_1) e capacidade de adesão dos extratos a enterobactérias (Y_2) (Gráfico 4.5). A área em verde do gráfico representa as regiões onde Y_1 será $>50\%$ e Y_2 será $>100\%$, correspondendo a uma atividade biológica maior que o produto comercial testado. As bandeiras brancas, localizadas sobre as regiões verdes indicam pontos representativos das regiões em que as respostas serão superiores as pré-estabelecidas. Nas condições de pH 1,3 e 13,0; tempo de 60 min e concentração do farelo de $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o modelo prevê rendimentos e capacidade de adesão dos extratos de 52,9 e 179,1%, respectivamente, para os processos realizados em pH 1,3; e 71,8 e 214,8%, respectivamente, para os processos realizados em pH 13,0.

GRÁFICO 4.5 - REGIÃO ÓTIMA IDENTIFICADA PELA SOBREPÓSICÃO DOS GRÁFICOS DE CONTOURNO DAS DUAS VARIÁVEIS RESPOSTAS: RENDIMENTO (Y_1) E CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS A ENTEROBACTÉRIAS (Y_2)



FONTE: O autor (2016).

Embora tenha se estabelecido uma concentração de farelo de soja de $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como condição ótima de extração, cabe ressaltar que os experimentos

foram realizados de forma estática, em escala analítica. Concentrações mais baixas de farelo de soja facilitam a agitação do material e acesso do solvente à matriz. Dessa forma, a ampliação da escala de extração pode requerer ajuste nas concentrações de farelo em função das condições operacionais existentes.

Experimentos de verificação foram conduzidos para confirmar a adequação dos modelos de regressão quanto à predição de valores das variáveis respostas. Para tanto, utilizou-se quatro condições dentro das faixas ótimas encontradas: pHs de 0,5; 1,3; 13,0 e 13,25; tempo igual a 60 min e concentração do farelo de 300 g·L⁻¹. Os valores experimentais obtidos e valores preditos estão listados na Tabela 4.11. As condições dos experimentos A, B e D não haviam sido testadas anteriormente, diferentemente, a condição do experimento C, já havia sido utilizada no ensaio 10 do DCCR.

TABELA 4.11 - VALORES EXPERIMENTAIS E PREDITOS DAS RESPOSTAS SOB CONDIÇÕES DE PROCESSO OTIMIZADAS

Ensaio	Variáveis do processo			Rendimento (%) ^a		Capacidade de Adesão a Enterobactérias (%) ^b	
	pH	Tempo (min)	Concentração do farelo (g·L ⁻¹)	Valor Predito	Valor experimental	Valor Predito	Valor experimental
A	0,5	60	300	61,2	53,9	218,6	219,9
B	1,3	60	300	52,9	45,6	179,3	183,5
C	13,0	60	300	71,8	77,3	214,9	215,8
D	13,25	60	300	75,1	87,8	228,1	13,9

NOTA: ^a Rendimento em percentagem do extrato aquoso em relação ao farelo de soja inicial (% m/m); ^b Considerando como 100% o n° de UFC encontrado para o Controle Positivo (Produto comercial BioMos®).

FONTE: O autor (2016).

Os resultados indicam que as respostas experimentais para os ensaios A, B e C estão em concordância com as respostas preditas dentro do intervalo de predição do modelo, a um nível de confiança de 95%. A otimização elevou o rendimento dos extratos brutos em 10x, passando de 7,9% (extrato bruto FS-A, antes da otimização – Capítulo 2) para 77,3% (extrato C). Portanto, estes resultados demonstram adequação do modelo empírico desenvolvido e sucesso na aplicação da metodologia de superfície de resposta para otimização das condições de extração de moléculas bioativas de farelo de soja, dentre as faixas de estudo pré-estabelecidas para este estudo.

O ensaio D, gerou valores de rendimento satisfatórios, no entanto os extratos gerados apresentaram baixíssima capacidade de adesão a enterobactérias, contrariando a predição do modelo. Algumas hipóteses podem ser propostas com o intuito de justificar a resposta obtida. A primeira hipótese relaciona-se ao fato de que para atingir o pH de 13,25 grande quantidade de NaOH foi utilizada, gerando alta quantidade de sal durante o processo de neutralização. As amostras foram testadas no ensaio de adesão com o sal, no entanto, a quantidade de amostra não foi corrigida. Dessa forma, a concentração real da amostra testada foi inferior, o que pode ter colaborado com os resultados de baixa atividade de adesão. A segunda hipótese está relacionada à alta força iônica gerada pelo sal resultante da neutralização. Esse sal pode ter ocasionado a precipitação de moléculas biotivas resultando em diminuição da atividade.

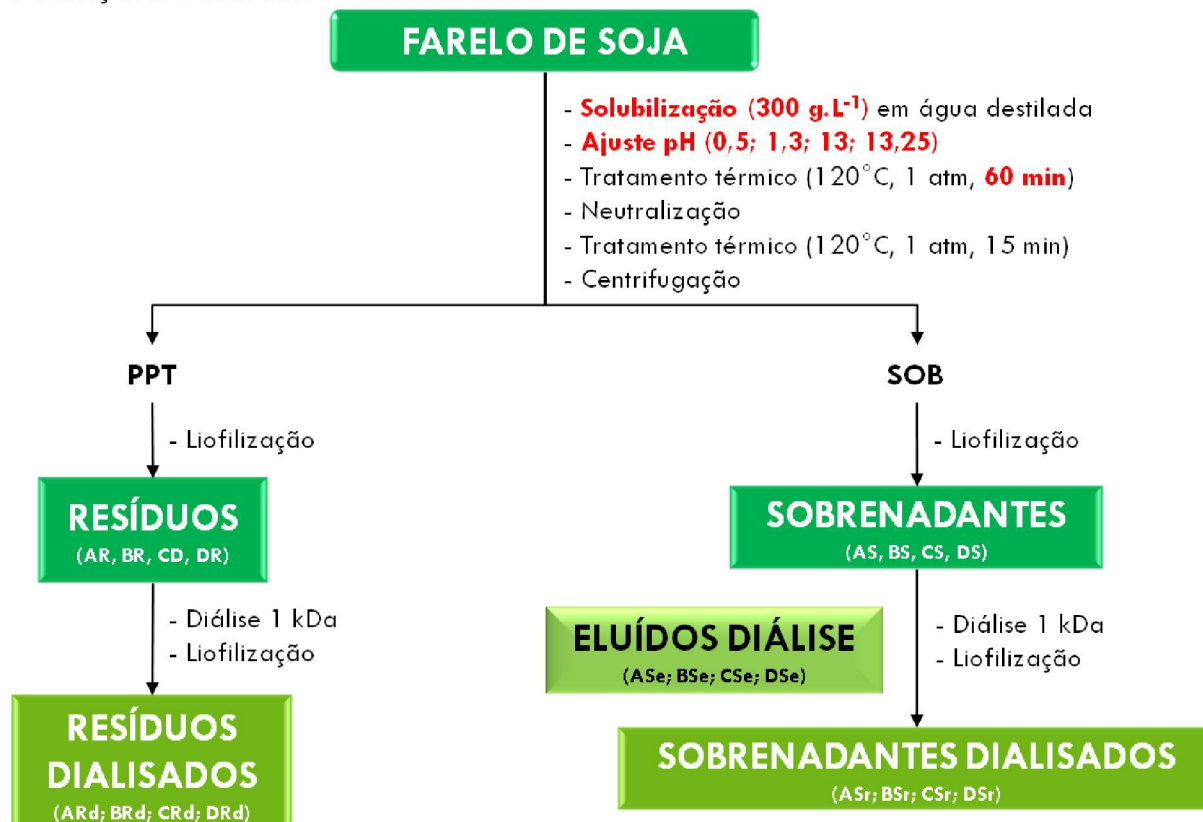
Apesar desse resultado o modelo não se invalida, visto que as demais respostas para os outros ensaios foram satisfatórias. Contudo, embora os resultados mostrem uma região ótima, cabe ressaltar que em função das respostas máximas do processo terem sido obtidas próximas aos limites axiais avaliados, a execução posterior de novos delineamentos, minimizando as faixas de estudo, podem trazer informações relevantes quanto à interação entre as variáveis estudadas, além de prever com maior clareza as condições operacionais mais adequadas, visando redução do custo final do processo e produção máxima.

4.3.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS OBTIDOS APÓS OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

Objetivando conhecer todas as frações obtidas pelo processo otimizado de extração, e identificar diferenças entre esses extratos, todas as amostras obtidas pelo ensaio de validação foram analisadas quanto à sua composição. Além dos sobrenadantes (AS, BS, CS e DS), os resíduos (AR, BR, CR e DR) obtidos após o tratamento termoquímico, também foram estudados. Para retirada de sais e compostos de baixa massa formados durante extração, os resíduos foram dialisados, em sistema aberto, sob agitação magnética, em membranas de 1 kDa, seguidos de liofilização, gerando as frações de resíduos dialisados: ARd, BRd, CRd e DRd. Os sobrenadantes foram também submetidos à diálise, sob agitação magnética, em membranas de 1 kDa, porém em sistema fechado. As trocas de água foram realizadas a cada 4 horas por três vezes. Após diálise, as frações retidas (r)

pela membrana foram concentradas e liofilizadas gerando as frações de sobrenadante dialisadas: ASr, BSr, CSr e DSr. As frações eluídas (e) nas águas das diálises foram concentradas e liofilizadas, gerando as frações ASe, BSe, CSe e DSe. O esquema geral para obtenção dessas frações é apresentado na Figura 4.8.

FIGURA 4.8 - FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FARELO DE SOJA SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO



NOTA: PPT: Precipitado; SOB: Sobrenadante.
FONTE: O autor (2016).

Os eluídos da diálise foram analisados apenas por termogravimetria, possibilitando a quantificação do sal formado em cada processo de extração. Todas as outras frações obtidas foram analisadas quanto à sua capacidade de adesão a enterobactérias, composição química, análises térmicas e de RMN de ^{13}C . Adicionalmente, as frações que apresentaram maior potencial de adesão foram avaliadas quanto à estabilidade num processo de digestão *in vitro* e o potencial de inibição da adesão de *Salmonella* spp. a placas imobilizadas com receptores análogos conhecidos.

As extrações em pH alcalino geraram as frações sobrenadantes de maiores rendimentos (CS = 77,34% e DS = 87,8%) (Tabela 4.12). Todas as frações, após

processo de diálise, como esperado, diminuíram significativamente seu rendimento. De modo geral, as frações derivadas de resíduos perderam aproximadamente 50% da massa inicial do processo, já as frações derivadas de sobrenadante tiveram uma perda ainda maior, variando entre 76,6 – 98,5% da massa inicial do processo. Essa redução significativa do rendimento após diálise indica que além do sal, grandes quantidades de moléculas de baixa massa solúveis foram geradas durante o processo de extração.

TABELA 4.12 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO

Frações não dialisadas	Rendimento (%)^a	Frações Dialisadas	Rendimento (%)^b	Rendimento (%)^a
AS	53,9	ASr	1,6	0,9
AR	46,1	ARd	52,3	24,1
BS	45,6	BSr	4,5	2,0
BR	54,4	BRd	50,8	27,6
CS	77,3	CSr	23,4	18,1
CR	22,7	CRd	53,6	12,1
DS	87,8	DSr	12,8	11,2
DR	12,2	DRd	52,7	6,4

NOTA: AS, BS, CS, DS: Sobrenadantes das extrações; AR, BR, CR, DR: Resíduos das extrações; ASr, BSr, CSr, DSr: Sobrenadantes das extrações dialisados; ARr, BRr, CRr, DRr: Resíduos das extrações dialisados. ^a Rendimentos relativos a massa seca inicial de farelo de soja (% m/m); ^b Rendimentos relativos às frações antes do processo de diálise (% m/m).

FONTE: O autor (2016).

Todas as frações dialisadas e não dialisadas tiveram sua capacidade de adesão determinada (Tabela 4.13). A fração AR e as frações extraídas em pH 13,5: DS, DR, DSr e DRd, apresentaram capacidade de adesão a enterobactérias estatisticamente iguais ao controle negativo (13,9 – 71,8%), indicando um baixo número de UFC aderidos às frações ($3,08 \times 10^3$ - $1,59 \times 10^4$). As frações ASr, BSr, e CSr se destacam das demais, sendo estatisticamente melhores que o controle positivo, apresentando capacidade de adesão entre 348,5 – 792,4%. A fração CSr, apresentou a maior quantidade de células aderidas/3 mg de amostra: $1,76 \times 10^5$ UFC. As frações restantes apresentaram capacidade de adesão estatisticamente igual ao controle positivo (89,1 – 216,2%), com número de células variando entre $1,97 \times 10^4$ – $4,79 \times 10^4$ UFC/3 mg.

TABELA 4.13 - CAPACIDADE DE ADESÃO DAS FRAÇÕES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO

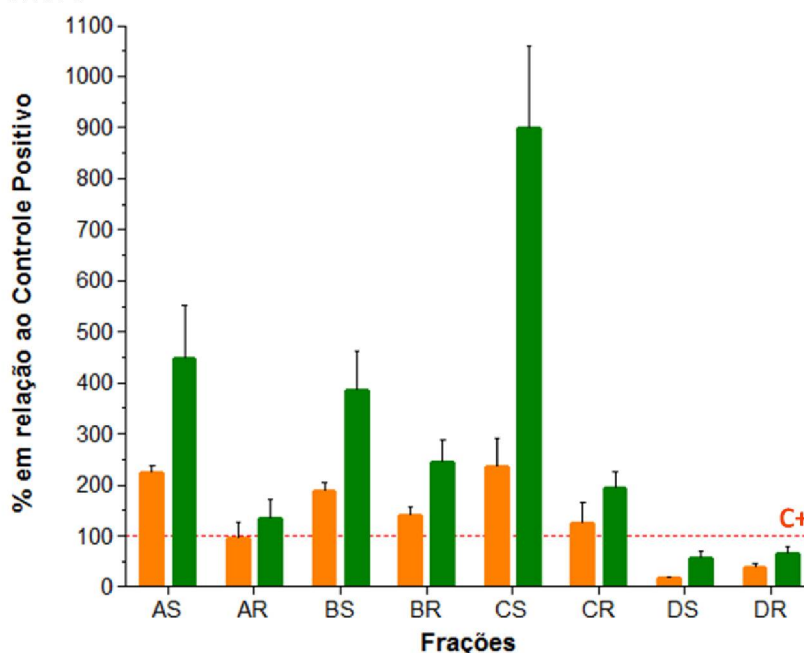
Frações não dialisadas	UFC/3 mg ^a	Capacidade de Adesão (%) ^b	Frações Dialisadas	UFC/3 mg ^a	Capacidade de Adesão (%) ^b
AS	4,87 x 10 ⁴ ^A	219,9	ASr	9,27 x 10 ⁴ ^{A*}	418,4
AR	1,59 x 10 ⁴	71,8	ARd	2,42 x 10 ⁴ ^A	109,4
BS	4,07 x 10 ⁴ ^A	183,5	BSr	7,73 x 10 ⁴ ^{A*}	348,5
BR	2,89 x 10 ⁴ ^A	130,4	BRd	4,79 x 10 ⁴ ^A	216,2
CS	4,78 x 10 ⁴ ^A	215,8	CSr	1,76 x 10 ⁵ ^{A*}	792,4
CR	1,97 x 10 ⁴ ^A	89,1	CRd	3,99 x 10 ⁴ ^A	179,9
DS	3,08 x 10 ³	13,9	DSr	1,11 x 10 ⁴	50,1
DR	6,43 x 10 ³	29,0	DRd	1,30 x 10 ⁴	58,7

NOTA: AS, BS, CS, DS: Sobrenadantes das extrações; AR, BR, CR, DR: Resíduos das extrações; ASr, BSr, CSr, DSr: Sobrenadantes das extrações dialisados; ARr, BRr, CRr, DRr: Resíduos das extrações dialisados. C+: aderiu $2,22 \times 10^4$ UFC/3 mg; C-: aderiu $5,91 \times 10^3$ UFC/3 mg. ^a Número de UFC determinados a partir da regressão linear $y = -0,9118x + 8,3222$ ($R^2 = 0,9965$); ^b Capacidade de adesão dos extratos testados em relação ao controle positivo; ^A Frações apresentam capacidade de adesão a enterobactérias estatisticamente igual ao controle positivo à nível de significância de 95%; ^{A*} Frações apresentam capacidade de adesão a enterobactérias estatisticamente superior ao controle positivo à nível de significância de 95%. Dados representam valores médios.

FONTE: O autor (2016).

Comparando-se todas as frações, é possível observar pela Figura 4.9 que a capacidade de adesão foi potencializada após o processo de diálise, independente da condição de extração. Os sobrenadantes e resíduos obtidos em condições ácidas de extração (AS, BS, AR e BR), aumentaram a capacidade de adesão em aproximadamente 1,9 e 1,7 vezes. Já os sobrenadantes e resíduos obtidos em condições alcalinas (CS, DS, CR e DR), aumentaram sua capacidade de adesão em 3,7 e 2,0 vezes. O aumento na capacidade de adesão parece estar vinculado ao tipo de extração, visto que as proporções de aumento foram semelhantes quando comparado às frações extraídas em condições similares. Esse aumento da atividade biológica pode ser decorrente da concentração de moléculas bioativas no extrato após eliminação do sal e compostos de baixa massa. Embora a atividade após diálise aumente significativamente, o rendimento dos extratos é reduzido, como visto anteriormente. Dessa forma, a inserção de uma etapa de purificação ao processo acarreta aumento do custo, devendo ser avaliado com parcimônia.

FIGURA 4.9 - CAPACIDADE DE ADESÃO DOS EXTRATOS TESTADOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO



NOTA: Dados representam valores médios \pm DP. C+: Controle positivo; Frações não dialisadas (■), Frações dialisadas (■).

FONTE: O autor (2016).

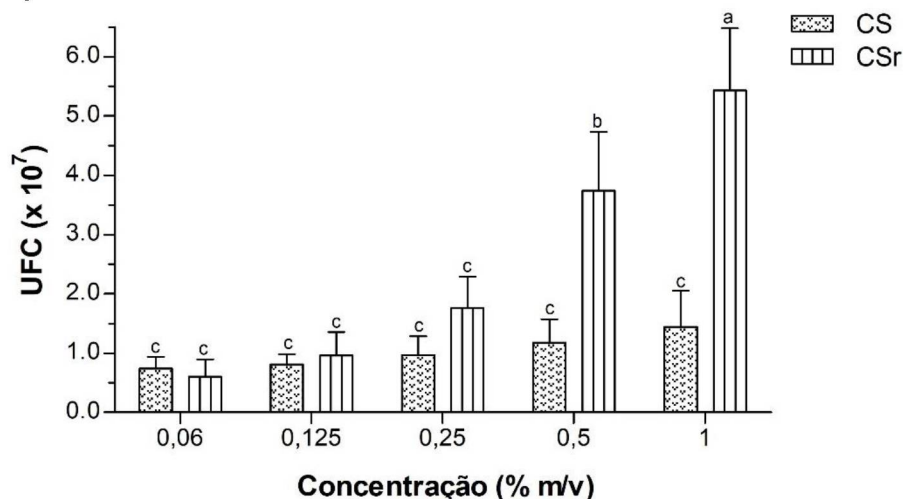
Adicionalmente as frações CSr (que apresentou maior potencial de adesão - 792,4% em relação ao C+) e CS (fração que a deu origem - 215,8% em relação ao C+) foram ressubmetidas aos ensaios de capacidade de adesão variando-se as concentrações de amostras imobilizadas à microplaca. As soluções com amostras foram diluídas seriadamente, partindo-se de uma solução de concentração 1% m/v (3 mg/ poço) até 0,06% m/v (180 μ g/poço) (Gráfico 4.6).

É possível observar para a fração CSr um comportamento dose dependente, dentre as concentrações analisadas. Para a fração CS, é possível observar também um aumento do número de células aderidas em função da concentração de produto imobilizado. No entanto, essa diferença é mais sutil quando comparada à fração CSr. Comportamento dose dependente foi também relatado por Fessele e Lindhorst (2013), ao testar a capacidade de ligação de glicosídeos sintéticos à *E. coli*, em concentrações variando entre 0,007 - 4% m/v.

A fração CS aderiu entre $5,43 \times 10^7$ – $6,02 \times 10^6$ UFC (Tabela 4.14). As concentrações 1 e 0,5% m/v se destacaram das demais, apresentando diferença significativa entre si e capacidade de adesão estatisticamente superior ao controle positivo, aderindo 750 e 516,6% a mais de bactérias que o controle,

respectivamente. Uma concentração de 0,46% m/v é necessária para atingir metade do número máximo de células aderidas, num intervalo de confiança de 95%.

GRÁFICO 4.6 - CAPACIDADE DE ADESÃO DAS FRAÇÕES CS E CSr EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



NOTA: CS: Sobrenadante da extração obtido em pH 13,0; CSr: Sobrenadante da extração, obtido em pH 13,0 após diálise. Dados representam valores médios \pm DP. ^a Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

TABELA 4.14 - CAPACIDADE DE ADESÃO DA ADESÃO DAS FRAÇÕES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Frações	UFC ^a	Capacidade de Adesão (%) ^b
CS 1%	$1,44 \times 10^7$ C	198,9
CS 0,5%	$1,18 \times 10^7$ C	163,0
CS 0,25%	$9,67 \times 10^6$ C	133,6
CS 0,125%	$8,07 \times 10^6$ C	111,5
CS 0,06%	$7,42 \times 10^6$ C	102,5
CSr 1%	$5,43 \times 10^7$ A	750,0
CSr 0,5%	$3,74 \times 10^7$ B	516,6
CSr 0,25%	$1,76 \times 10^7$ C	243,1
CSr 0,125%	$9,64 \times 10^6$ C	133,1
CSr 0,06%	$6,02 \times 10^6$ C	83,1

NOTA: CS: Sobrenadante da extração obtido em pH 13,0; CSr: Sobrenadante da extração, obtido em pH 13,0 após diálise. C+: aderiu $7,24 \times 10^6$ UFC/3 mg; ^a Número de UFC determinados a partir da regressão linear $y = -0,8249x + 10,269$ ($R^2 = 0,9981$); ^b Capacidade de adesão dos extratos testados em relação ao controle positivo. Dados representam valores médios. ^A Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

A fração CS aderiu entre $1,44 \times 10^7$ – $7,42 \times 10^6$ UFC, apresentando atividade semelhante ao produto comercial em todas as concentrações testadas. Para que o número máximo de bactérias aderidas a esta fração caísse pela metade

foi necessária uma dose 6x menor. Adicionalmente, não há diferença significativa entre as concentrações estudadas. Por essas razões, na faixa de estudo analisada, não foi possível afirmar que CS apresenta um comportamento dose dependente.

4.3.4.1 Potencial de Inibição da Adesão *in vitro* e Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos de Farelo de Soja sobre *Salmonella* spp.

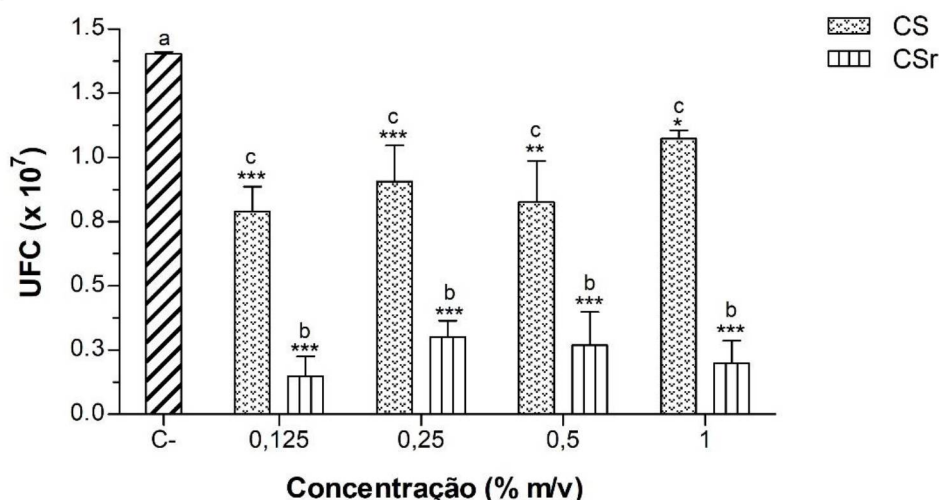
Para avaliar se o efeito de adesão das amostras imobilizadas às bactérias é diferente de seus efeitos em solução, as amostras CS e CSr foram usadas como interferentes da adesão bacteriana numa microplaca previamente revestida com mananas derivadas de parede celular de levedura. Deste modo, é possível determinar o potencial de inibição que tais moléculas apresentam frente a um receptor análogo conhecido, uma vez que a microplaca revestida com mananas compete com os potenciais inibidores em solução para a ligação às bactérias, de modo a que a adesão bacteriana é parcialmente inibida.

O experimento é similar ao de determinação do potencial de adesão, diferenciando-se apenas em duas etapas principais: na primeira, onde um produto derivado de levedura, com atividade conhecida, é imobilizado à microplaca; e na terceira, onde são adicionados os potenciais inibidores juntamente com a suspensão bacteriana (Figura 4.3). O potencial de inibição é determinado em comparação ao controle negativo, que consiste apenas do produto derivado de levedura e bactérias. Um alto poder de inibição é resultado de um alto poder de adesão desses produtos às bactérias, indicando que mais bactérias se aderiram aos potenciais inibidores e não as mananas imobilizadas às microplacas. Assim, no momento da lavagem ocorrida na última etapa do processo, esse complexo inibidor+bactéria é lavado da microplaca, restando apenas a bactéria que ficou aderida às mananas de leveduras.

Observa-se, a partir do Gráfico 4.7, que todas as frações inibiram a adesão, diferindo-se estatisticamente do controle negativo quanto ao número de bactérias aderidas à microplaca. Todas as frações CS apresentaram um potencial de inibição menor que as frações CSr. Esse aumento da atividade biológica para fração CSr indica que o processo de diálise desta fração concentrou as moléculas bioativas no extrato após eliminação do sal e compostos de baixa massa, corroborando com os dados de capacidade de adesão apresentados anteriormente (item 4.3.4), onde a fração CSr apresentou potencial de adesão superior a CS.

Todas as amostras apresentaram comportamento linear em relação à variação da concentração de inibidores utilizados. A fração CS apresentou potencial de inibição entre 17,1 – 38,8%, aderindo entre $7,89 \times 10^6$ x $1,07 \times 10^7$ UFC (Tabela 4.15). Já a fração CSr se mostrou estatisticamente melhor que CS, com potencial de inibição entre 76,6 – 88,5%, aderindo entre $1,48 \times 10^6$ – $3,02 \times 10^6$ UFC.

GRÁFICO 4.7 - INIBIÇÃO DA ADESÃO DE ENTEROBACTÉRIAS A MANANAS ADERIDAS EM MICROPLACAS



NOTA: CS: Sobrenadante da extração obtido em pH 13,0; CSr: Sobrenadante da extração, obtido em pH 13,0 após diálise. Dados representam valores médios \pm DP. ^a Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

FONTE: O autor (2016).

TABELA 4.15 - POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DAS FRAÇÕES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO

Frações	UFC ^a	Inibição (%)
CS 1%	$1,07 \times 10^7$ ^C	17,1
CS 0,5%	$8,27 \times 10^6$ ^C	35,9
CS 0,25%	$9,07 \times 10^6$ ^C	29,7
CS 0,125%	$7,89 \times 10^6$ ^C	38,8
CSr 1%	$1,99 \times 10^6$ ^B	84,6
CSr 0,5%	$2,68 \times 10^6$ ^B	79,2
CSr 0,25%	$3,02 \times 10^6$ ^B	76,6
CSr 0,125%	$1,48 \times 10^6$ ^B	88,5
C-	$1,29 \times 10^7$ ^A	-

NOTA: CS: Sobrenadante da extração obtido em pH 13,0; CSr: Sobrenadante da extração, obtido em pH 13,0 após diálise. ^a Número de UFC determinados a partir da regressão linear $y = -0,8891x + 10,21$ ($R^2 = 0,9985$). Dados representam valores médios. ^A Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2016).

Comportamento linear de inibição da adesão de patógenos, como encontrado neste trabalho, envolvendo polissacarídeos ou glicoconjugados já foi

relatado por outros autores. Gonzalez-Ortiz et al. (2013) e Gonzalez-Ortiz et al. (2014) evidenciou esse comportamento ao estudar o potencial de inibição de diferentes concentrações (0,01 – 1% m/v) de extratos de alfarroba, farinha de trigo, glicomacropéptido e exopolissacarídeos de salmoura de azeitona sobre adesão de *E. coli* às células IPEC-J2. Concentração de 1% m/v, inibiu aproximadamente 90% da adesão para todos os extratos analisados. Mantle e Husar (1993) testaram o potencial de galactose, *N*-acetilgalactosamina e lactose em inibir a adesão de *Yersinia enterocolitica* à mucina. Diferentes concentrações (0,125 – 0,5 M·mL⁻¹) foram analisadas, resultando em comportamento linear de inibição, atingindo um máximo de 66% de inibição para a galactose. Polissacarídeos ácidos de banana-da-terra, em concentrações de 0,5 e 5% m/v foram capazes de inibir 90 e 80%, respectivamente, da adesão de *S. enterica* sv. Typhimurium às células epiteliais intestinais, conforme resultados mostrados por Roberts et al. (2013). Demais concentrações analisadas (0,005 - 0,05% m/v), não apresentaram potencial de adesão significativo.

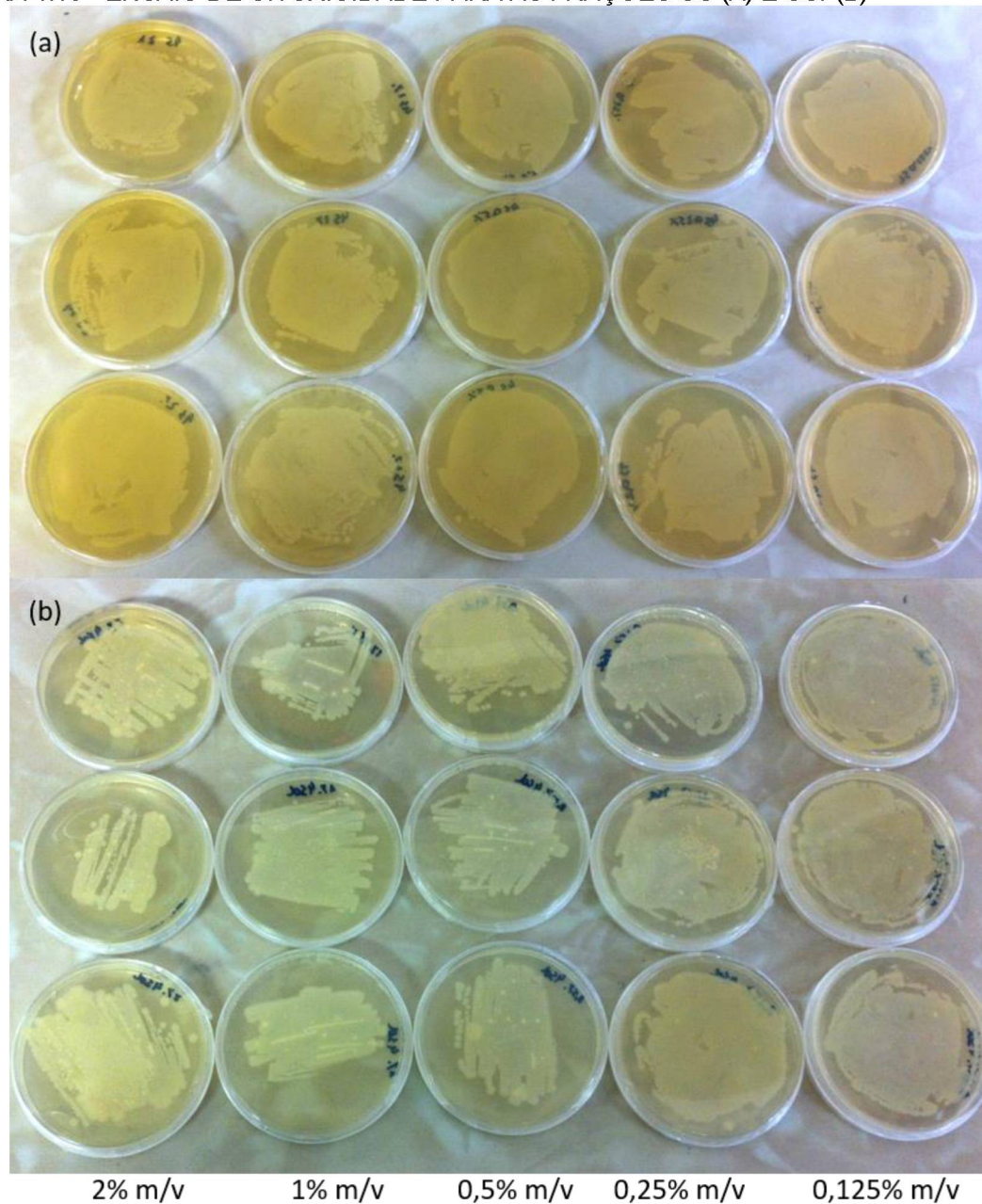
Diversos extratos vegetais, proteínas e carboidratos têm sido descritos como potenciais antimicrobianos (JEON; PARK; KIM, 2001; NO et al., 2002; ZHENG; ZHU, 2003; OETTING et al., 2006; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; VASCONCELLOS et al., 2014). Para identificar se os resultados de inibição da adesão de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, obtidos neste estudo, foi decorrente de uma inibição específica dos produtos testados ou então causada por algum outro efeito ou ação citotóxica destes sobre as bactérias, as amostras CS e CSr, em diferentes concentrações (0,125 – 2% m/v), foram incubadas com as bactérias e o crescimento bacteriano foi avaliado em placas de ágar (Figura 4.10).

Análise qualitativa permitiu identificar crescimento bacteriano para todas as amostras, independente da concentração, sugerindo que nenhum dos extratos estudados apresenta efeito citotóxico sobre o micro-organismo. Dessa forma, é possível sugerir que o efeito de inibição da adesão foi resultado de inibição específica decorrente da adesão entre o extrato e a bactéria, impedindo a adesão às mananas previamente immobilizadas à microplaca.

Determinação de atividade antimicrobiana, por meio de ensaios que envolve medição de halo de inibição, podem fornecer resultados adicionais, não abrangidos no teste realizado neste estudo. Ensaios quantitativos, utilizando solução de bactéria mais diluída, podem fornecer resultados mais precisos, informando o número de

UFC que cresceu em cada uma das concentrações utilizadas e possibilitando comparações estatísticas entre elas.

FIGURA 4.10 - ENSAIO DE CITOXICIDADE PARA AS FRAÇÕES CS (A) E CSr (B)



FONTE: O autor (2016).

4.3.4.2 Digestão *in vitro*

Uma das características essenciais a um aditivo utilizado em ração animal, com propriedades anti-adesão de patógenos, é não ser metabolizado no trato gastrointestinal superior. A fim de avaliar esta característica, as amostras CS e CSr

foram também submetidas à digestão *in vitro* segundo metodologia proposta por Monro, Mishra e Venn (2010) e adaptada por Carnachan et al. (2012).

Estudos de digestão *in vivo*, para estudo do comportamento gastrointestinal de produtos, envolve muitas vezes a sujeição de animais a condições desconfortáveis e/ou sacrifício, além de serem caros, laboriosos e propensos a variações inerente aos animais (MCCLEMENTS; LI, 2010). Inversamente, métodos *in vitro* são mais baratos, menos laboriosos e não sofrem restrições éticas (MINEKUS et al., 2014), por essa razão têm sido largamente utilizados para estudar o comportamento gastrointestinal de alimentos e produtos farmacêuticos (HUR et al., 2011; MINEKUS et al., 2014). Estes métodos imitam as condições fisiológicas *in vivo*, tendo em conta a presença de enzimas digestivas e suas concentrações, pH, tempo de digestão, presença de sais, entre outros fatores. Embora os métodos *in vitro* não substituam os *in vivo* em termos de precisão de detalhes e respostas obtidas, eles fornecem uma série de informações que podem funcionar como *screening* em razão das respostas que estão sendo procuradas (BOISEN; FERNÁNDEZ, 1997).

Métodos desenvolvidos para suínos são normalmente também validados para aves (frangos) (BOISEN; FERNÁNDEZ, 1997; VAN DER KLIS; KWAKERNAAK, 2014). Modelos estáticos de digestão *in vitro* incluem duas etapas principais, simulando primeiramente a digestão gástrica, seguida da digestão intestinal. Variações ocorrem entre modelos, de modo geral, na etapa da digestão gástrica o material é diluído e digerido com pepsina e ácido clorídrico até pH 2,0-2,5, seguido por uma digestão intestinal em pH 6-7,5 com pancreatina. Etapas adicionais envolvendo fermentação intestinal podem ser executadas. Neste trabalho, apenas as duas primeiras etapas de digestão foram realizadas, adicionando-se amiloglicosidase para completar a digestão de amido. Amido, celulose microcristalina e pectina de maçã foram utilizados como controle de processo, uma vez que amido seria totalmente degradado (permanecendo no sobrenadante etanólico), celulose permaneceria insolúvel e inacessível à reação (permanecendo como fibras insolúveis) e a pectina de maçã, embora solúvel não é degradada na digestão (permanecendo como fibras solúveis).

Após todas as etapas da digestão *in vitro*, é possível observar pelos rendimentos das frações descritos na Tabela 4.16, que a fração CS foi mais suscetível à degradação do que a fração CSr, uma vez que o percentual de material

degradado (CS-MD) corresponde a 83,4% m/m em relação ao material inicialmente utilizado. Esse resultado era esperado, uma vez que dados demonstrados anteriormente evidenciaram que esta fração contém um alto percentual de sais e compostos de baixa massa (item 4.3.4). Em relação ao material não degradado (CS-FS e CS-FI), grande parte corresponde a fibras solúveis (14% m/m em relação ao material inicialmente utilizado).

TABELA 4.16 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES APÓS DIGESTÃO *IN VITRO* DAS FRAÇÕES CS E CSr

Frações		Rendimento (%) ^a	Frações		Rendimento (%) ^a
CS	CS-FS	14,0	CSr	CSr-FS	23,7
	CS-FI	2,6		CSr-FI	12,9
	CS-MD	83,4		CSr-MD	63,4

NOTA: CS: Sobrenadante da extração obtido em pH 13,0; CS-FS, CS-FI e CS-MD: Fibras solúveis, insolúveis e material digerido, respectivamente, obtido após digestão *in vitro* da fração CS; CSr: Sobrenadante da extração, obtido em pH 13,0 após diálise; CSr-FS, CSr-FI e CSr-MD: Fibras solúveis, insolúveis e material digerido, respectivamente, obtido após digestão *in vitro* da fração CSr. ^a Rendimentos relativos às frações antes do processo de digestão *in vitro* (% m/m).

FONTE: O autor (2016).

Para a fração CSr, observa-se que 63,4% m/m de todo material inicialmente utilizado foi suscetível à digestão *in vitro* (CSr-MD). Em relação ao material não degradado, 23,7% m/m corresponde a fibras solúveis (CSr-FS) e 12,9% m/m às fibras insolúveis (CSr-FI). Carnachan et al. (2012) relatam em seu trabalho que a fração de fibras insolúveis pode conter além de polissacarídeos resistentes à digestão, material inicialmente insolúvel, permanecendo inacessível à digestão e mantendo-se com sua estrutura inalterada.

Após processo de digestão, as frações CS-FS, CSr-FS e CSr-FI foram reavaliadas quanto ao potencial de adesão, objetivando verificar se o processo de digestão causou alterações deletérias para a atividade biológica. As frações CS-MD e CSr-MD não tiveram seu potencial de adesão reavaliado, pois correspondem as frações que não apresentaram estabilidade ao processo de digestão, sendo provavelmente absorvidas antes do local onde seu efeito anti-adesão seria iniciado. A fração CS-FI não foi analisada em função do baixo rendimento obtido.

A Tabela 4.17 apresenta os resultados de capacidade de adesão das frações CS e CSr após digestão *in vitro*. Observa-se que todas as frações após o processo obtiveram potencial de adesão estatisticamente superior ao controle positivo.

A fração CS-FS, derivada de CS, aumentou sua atividade em aproximadamente 300%, aderindo $3,24 \times 10^5$ UFC/3 mg de amostra testada. As frações CSr-FS e CSr-FI, aderiram $3,86$ e $4,61 \times 10^5$ UFC/3 mg de amostra testada, respectivamente, mantendo o alto potencial de adesão da fração mãe CSr. Esses resultados mostram que ambas as frações, embora parcialmente suscetíveis ao processo de digestão, mantém o potencial de adesão atribuído inicialmente, reforçando a ideia de possíveis substitutos ao produto comercial existente. Encapsulamento desses materiais pode ser uma alternativa para manter a estabilidade desses produtos frente às condições de digestão.

TABELA 4.17 - CAPACIDADE DE ADESÃO DAS FRAÇÕES CS E CSr APÓS DIGESTÃO *IN VITRO*

Frações	UFC/3 mg ^a	Capacidade de Adesão (%) ^b	Frações	UFC/3 mg ^a	Capacidade de Adesão (%) ^b
CS	$1,34 \times 10^{5A}$	207,2	CSr	$4,74 \times 10^{5B*}$	735,2
CS-FS	$3,24 \times 10^{5B*}$	502,9	CSr-FS	$3,86 \times 10^{5B*}$	599,4
			CSr-FI	$4,61 \times 10^{5B*}$	715,6

NOTA: CS: Sobrenadante da extração obtido em pH 13,0; CS-FS: Fibras solúveis obtidas após digestão *in vitro* da fração CS; CSr: Sobrenadante da extração, obtido em pH 13,0 após diálise; CSr-FS e CSr-FI: Fibras solúveis e insolúveis, respectivamente, obtidas após digestão *in vitro* da fração CSr. C+: aderiu $6,45 \times 10^4$ UFC/3 mg; C-: aderiu $1,65 \times 10^4$ UFC/3 mg. ^a Número de UFC determinados a partir da regressão linear $y = -0,8891x + 10,21$ ($R^2 = 0,9985$); ^b Capacidade de adesão dos extratos testados em relação ao controle positivo; ^A Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$); * Frações apresentam capacidade de adesão a enterobactérias estatisticamente superior ao controle positivo à nível de significância de 95%. Dados representam valores médios.

FONTE: O autor (2016).

4.3.4.3 Análises Químicas e de Ressonância Magnética Nuclear

Todas as frações sobrenadantes obtidas foram analisadas comparativamente quanto a teor de carboidratos totais e proteínas (Tabela 4.18). Observa-se que as frações apresentaram teores de carboidratos entre 11,8 – 47,3% e teores de proteínas entre 19,6 – 40,8%. De modo geral, após a diálise, os valores de carboidratos e proteínas aumentaram. Isso se deve em decorrência da presença de sal nas frações não dialisadas, gerando teores subestimados.

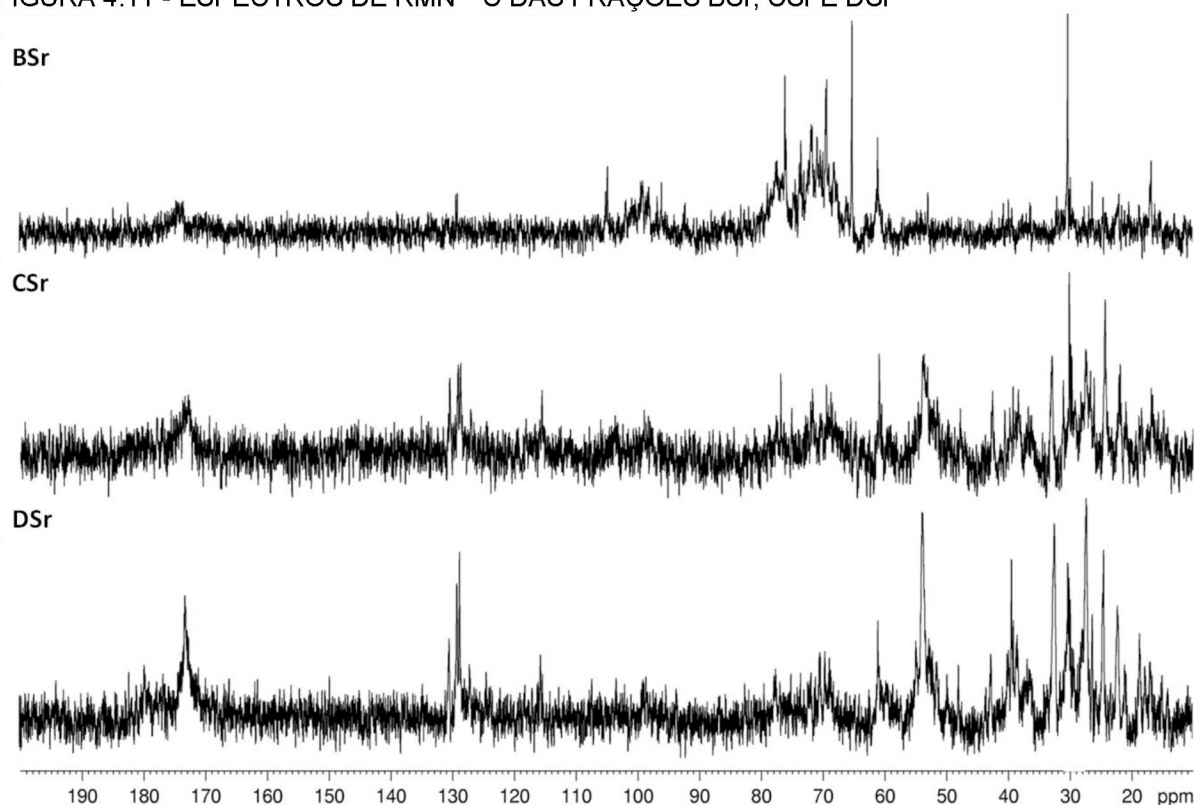
TABELA 4.18 - ANÁLISES QUÍMICAS DOS SOBRENADANTES, ANTES E APÓS DIÁLISE, OBTIDAS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE PROCESSO

Frações Dialisadas	Carboidratos Totais (%) ^a	Proteínas (%) ^b
AS	11,8	32,4
ASr	14,3	40,8
BS	24,5	19,6
BSr	47,3	25,5
CS	25,1	35,0
CSr	21,2	36,2
DS	19,0	27,6
DSr	23,1	26,6

NOTA: AS, BS, CS, DS: Sobrenadantes das extrações; ASr, BSr, CSr, DSr: Sobrenadantes das extrações dialisados. ^a Dubois et al. (1956); ^b Lowry et al. (1951).

FONTE: O autor (2016).

Os sobrenadantes dialisados BSr, CSr e DSr foram comparados por RMN de ¹³C (Figura 4.11). Observa-se, nas frações CSr e DSr, sinais intensos característicos de proteínas: 40–10, 65–50, 135–115 e 180–170 ppm, correspondentes a cadeias laterais alifáticas, carbonos- α , carbonos aromáticos e carbonos carbonílicos, respectivamente (OPELLA; FREY; CROSS, 1979; ZERI et al., 1996). Na fração BSr, as regiões correspondentes aos sinais de proteínas aparecem em menor intensidade, no entanto, visualiza-se sinais intensos característicos de carboidratos, entre 110 e 60 ppm. Essas informações corroboram com as dosagens colorimétricas, uma vez que o sobrenadante extraído em condição ácida (BSr) apresentou maior teor de carboidratos e menor teores de proteínas quando comparado aos sobrenadantes extraídos em condições alcalinas (CSr e DSr).

FIGURA 4.11 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES BSr, CSr E DSr

NOTA: Solvente: D_2O (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm).

FONTE: O autor (2016).

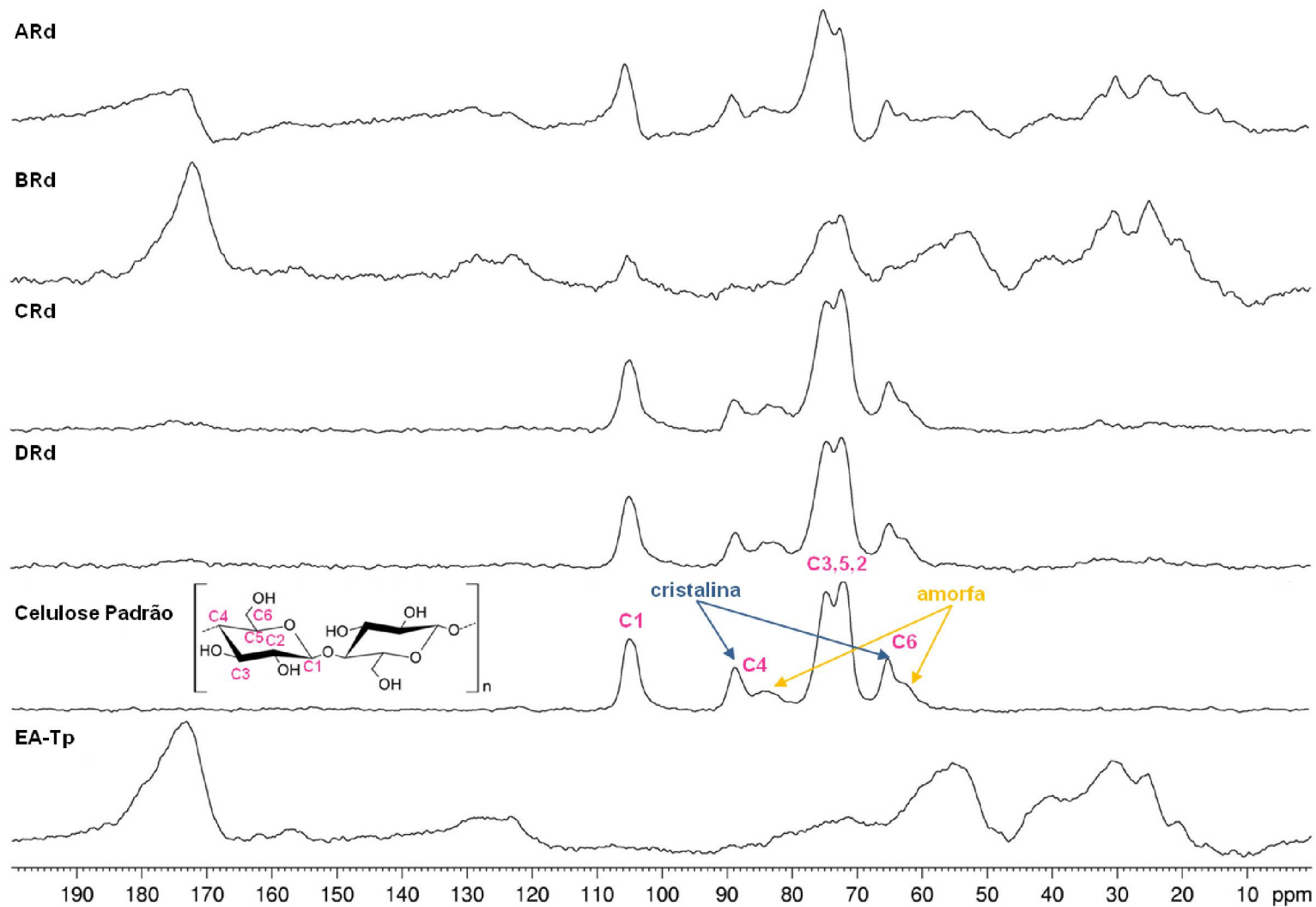
Os resíduos das extrações dialisados (ARd, BRd, CRd e DRd), em função da sua insolubilidade, foram analisados por ressonância magnética nuclear em estado sólido pela técnica Polarização Cruzada sob Rotação de Ângulo Mágico (CP/MAS) (Figura 4.12). As frações foram comparadas a um padrão de celulose, e a uma fração derivada de uma extração ácida de farelo de soja, rica em proteínas (84,6%).

Observa-se em todas as frações sinais correspondentes à celulose. Os sinais em 104,6 (C-1), 90–80 (C-4), 78–68 (C-2, C-3, C-5) e 67–58 ppm (C-6) correspondem às unidades de $\beta\text{-D-Glcp}$ (1→4)-ligadas da celulose (DUDLEY et al., 1983; KONO et al., 2002; FACKLER; SCHWANNINGER, 2012; MIAO et al., 2014). A presença de dois picos largos, nas regiões correspondente aos C-4 e C-6, indica que a celulose contém unidades cristalinas (88,5 e 64,9 ppm, respectivamente) e amorfas (83,8 e 62,6 ppm, respectivamente) (KONO et al., 2002; MIAO et al., 2014). A presença de celulose é compatível com a origem das frações, uma vez que estas correspondem à parte residual (insolúvel) da extração.

Nas frações ARd e BRd é possível observar também outros sinais, com aspectos alargados, correspondentes a proteínas. Os sinais entre 185-165 ppm correspondem aos carbonos carbonílicos da cadeia principal e grupos carboxílicos da cadeia lateral de aminoácidos ácidos; os sinais entre 135-115 ppm foram atribuídos aos carbonos da cadeia lateral de aminoácidos aromáticos; sinais entre 65-45 ppm e 45-25 foram atribuídos aos carbonos α e β , respectivamente; e os sinais entre 25-15 ppm correspondem aos grupos metil e metileno distantes da cadeia principal (MIZUNO et al., 2000; KEALLEY et al., 2008; MA et al., 2015). Praticamente não é possível observar os sinais correspondentes a proteínas nas frações CRd e DRd.

Estes resultados demonstram que as extrações alcalinas foram extremamente efetivas, uma vez que seus resíduos são compostos principalmente por celulose, e a maioria dos compostos extraídos permaneceu na fase solúvel. A presença de proteínas e celulose nos resíduos derivados das extrações ácidas indica que houve precipitação de proteínas durante o processo, o que corrobora com os valores menores, em comparação às extrações alcalinas, obtidos para os rendimentos da extração.

FIGURA 4.12 - ESPECTROS DE RMN CP/MAS ^{13}C DAS FRAÇÕES ARd, BRd, CRd, DRd, CELULOSE PADRÃO E AMOSTRA RICA EM PROTEÍNA (FS-Tp)



FONTE: O autor (2016).

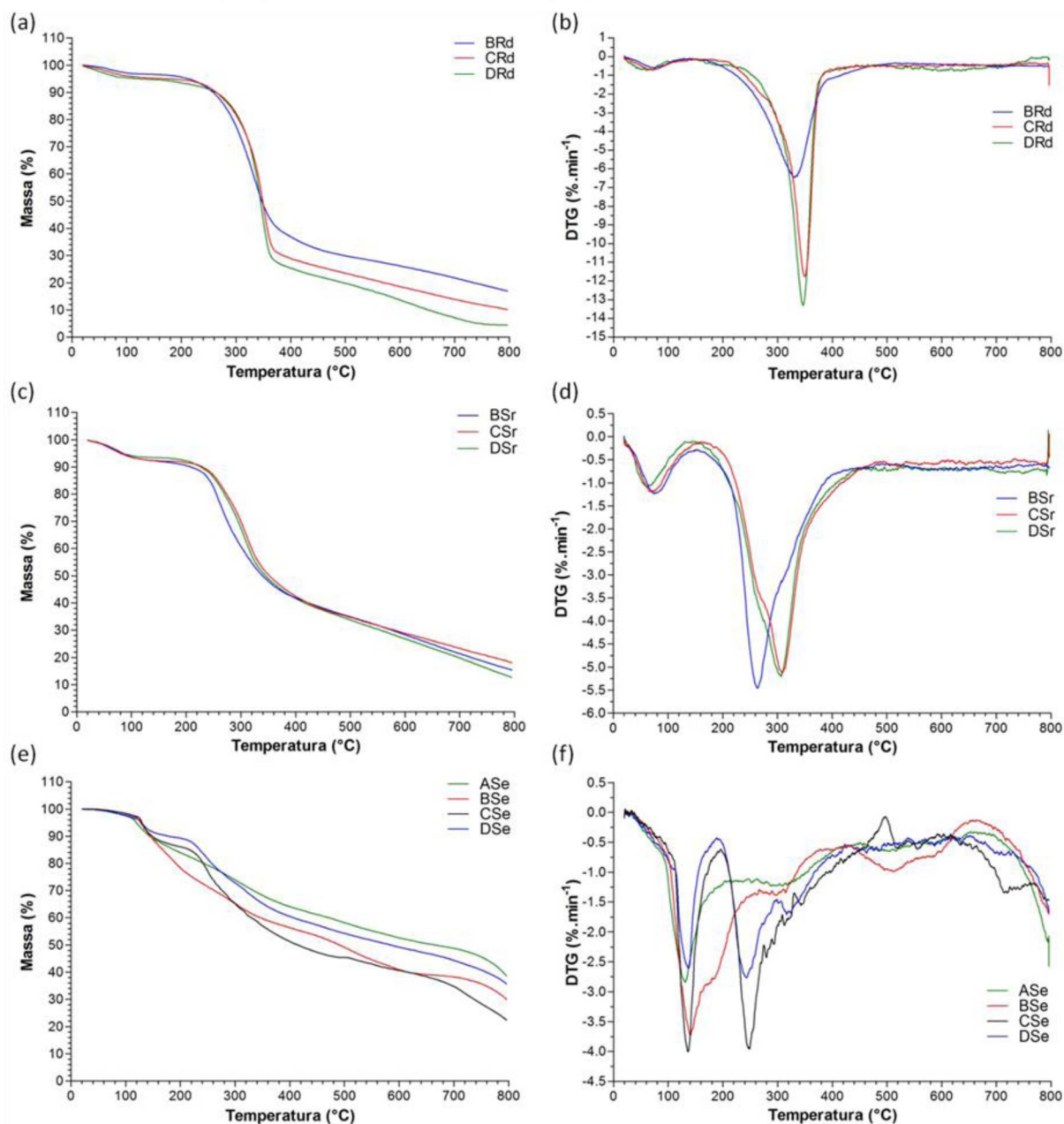
4.3.4.4 Análises Termogravimétricas

As frações B_{Sr}, C_{Sr} e D_{Sr} foram avaliadas quanto às suas características de degradação térmica. As análises termogravimétricas foram realizadas em função da perda da massa em temperatura controlada (25 – 800°C) numa atmosfera de nitrogênio. As curvas termogravimétricas (TG) obtidas e suas derivadas correspondentes (DTG) são mostradas na

Figura 4.13. Convém salientar que as curvas DTG contêm a mesma informação do que as curvas TG, porém permitem uma identificação dos eventos de degradação térmica de forma mais definida, sendo a área do pico de DTG diretamente proporcional à variação de massa.

Os resultados das análises termogravimétricas foram comparados com todos os outros resultados descritos anteriormente. De forma geral, observam-se comportamentos semelhantes no que diz respeito à perda de massa em todas as frações correspondentes ao mesmo grupo (resíduos, sobrenadantes e eluídos da diálise) e mesma condição de extração (pH ácido ou alcalino).

FIGURA 4.13 - CURVAS DE TG (a, c, e) E DTG (b, d, f) PARA OS RESÍDUOS (a, b), SOBRENADANTES (c, d) E ELUÍDOS DA DIÁLISE (e, f)

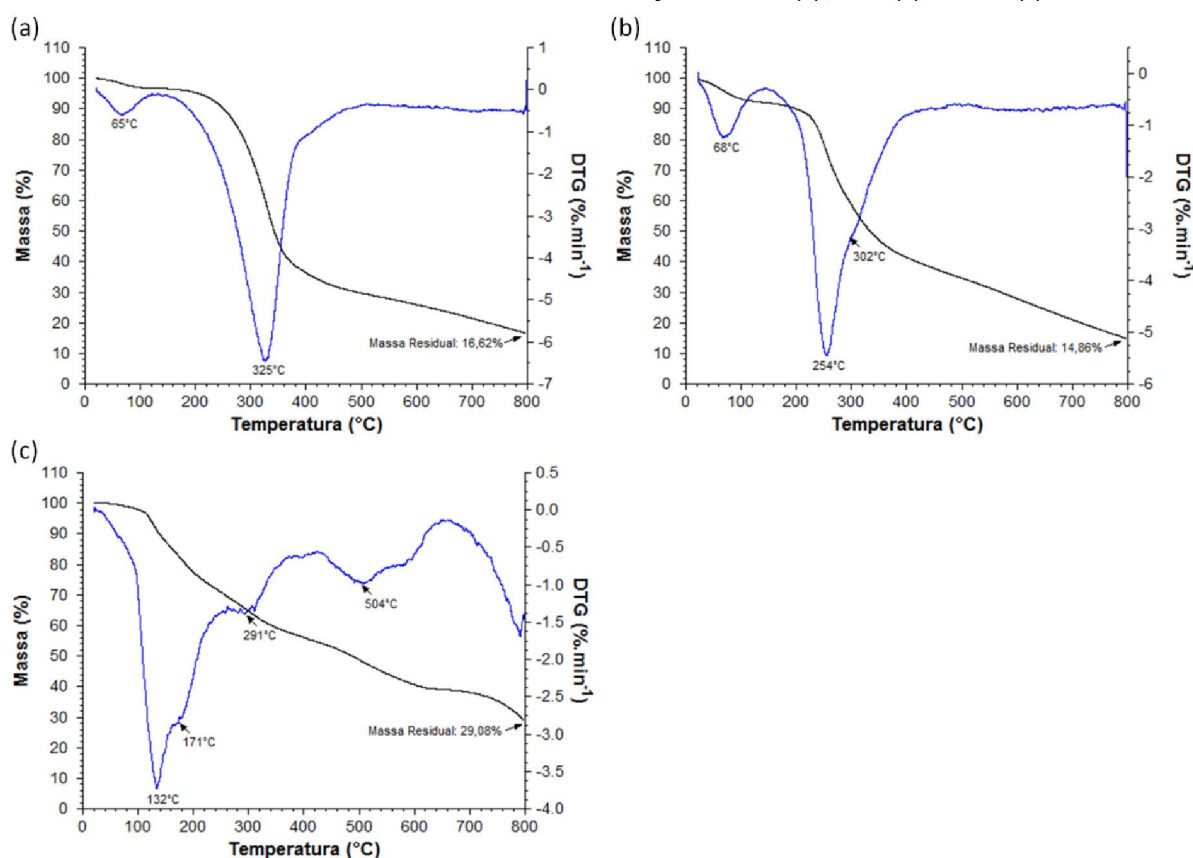


FONTE: O autor (2016).

Para permitir uma melhor avaliação, as curvas de TG e DTG das frações BRd, BSr e BSe foram analisadas separadamente (Figura 4.14). Três estágios distintos de decomposição são observados na degradação térmica de BRd (Figura 4.14a). O primeiro estágio ocorreu entre 20 e 132°C causando uma perda de massa de 2,6%, o segundo estágio de decomposição ocorreu entre 133 e 462°C com perda de massa de 66%, e o estágio final de degradação ocorreu entre 463 e 800°C com perda de massa de 14,8%.

Essa fração, como observado anteriormente pelo espectro de CP/MAS (Figura 4.12) é composta por proteínas e celulose. Assim, o primeiro estágio de decomposição da fração BRd corresponde à eliminação de água e dissociação de estruturas quaternárias de proteínas e carboidratos; a segunda fase de decomposição envolve a clivagem de ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos e dissociação de diferentes ligações das porções proteicas e glicídicas; e a fase final de decomposição envolve a completa decomposição de proteínas e carboidratos, com a liberação de diferentes gases, como CO, CO₂, e NH₃ (THAKUR et al., 2014). A massa residual após o terceiro estágio de degradação é atribuído à formação de cinzas. Segundo Maddi, Viamajala e Varanasi (2011) e Deng, Zhang e Wang (2008) pode haver estágios de sobreposição entre as temperaturas de degradação térmica de proteínas e carboidratos.

FIGURA 4.14 - CURVAS DE TG E DTG PARA AS FRAÇÕES BRd (a), BSr (b) E BSe (c)



FONTE: O autor (2016).

Para a fração BSr é possível observar também três estágios distintos de decomposição (Figura 4.14b). O primeiro estágio ocorreu entre 20 e 144°C causando uma perda de massa de 7,5%, o segundo estágio de decomposição

ocorreu entre 145 e 472°C com perda de massa de 56,8% e taxas máximas de decomposição em 254°C e 302°C, respectivamente, e o estágio final de degradação ocorreu entre 473 e 800°C com perda de massa de 20,8%. Comparando-se as curvas de TG e DTG dessa fração com um polissacarídeo purificado e uma amostra rica em proteína, ambas extraídas de farelo de soja em condições semelhantes (Apêndice 1), é possível inferir que o pico de temperatura em 254°C corresponde à degradação da parte glicídica da molécula, e o pico de temperatura em 302°C corresponde à decomposição da parte proteica. Observa-se ainda que as perdas de massas, 31,3 e 25,5% correspondentes ao primeiro e segundo pico de temperatura, estão em acordo com as dosagens de carboidratos totais e proteínas para essa amostra (47,3 e 25,5%).

Para a fração BSe observa-se diferentes estágios de decomposição (Figura 4.14c). Essa fração é altamente higroscópica, razão que justifica a alta perda de massa inicial, 12,3% com pico máximo em 132°C. A faixa de decomposição, logo após perda da água entre 150 – 400°C foi correlacionada com a decomposição de sacarose (EGGLESTON; TRASK-MORRELL; VERCELLOTTI, 1996; HURTTA, PITKÄNEN; KNUUTINEN, 2004), dissacarídeo comum entre as espécies vegetais (FERREIRA; SILVA; PERRONE, 2001) e já detectada em trabalho anterior (RODRIGUES, 2012). A degradação entre 400 – 650°C pode estar correlacionada com a oxidação de peptídeos parcialmente decompostos (NAYAK et al., 2011). A massa residual de 29,06% indica a presença de grandes quantidades de sais, uma vez que a fração BSr apresentou apenas 14,86% de massa residual. Sugere-se assim, que 14,2% da massa final obtida para a fração BS corresponde a sais formados durante o processo de extração.

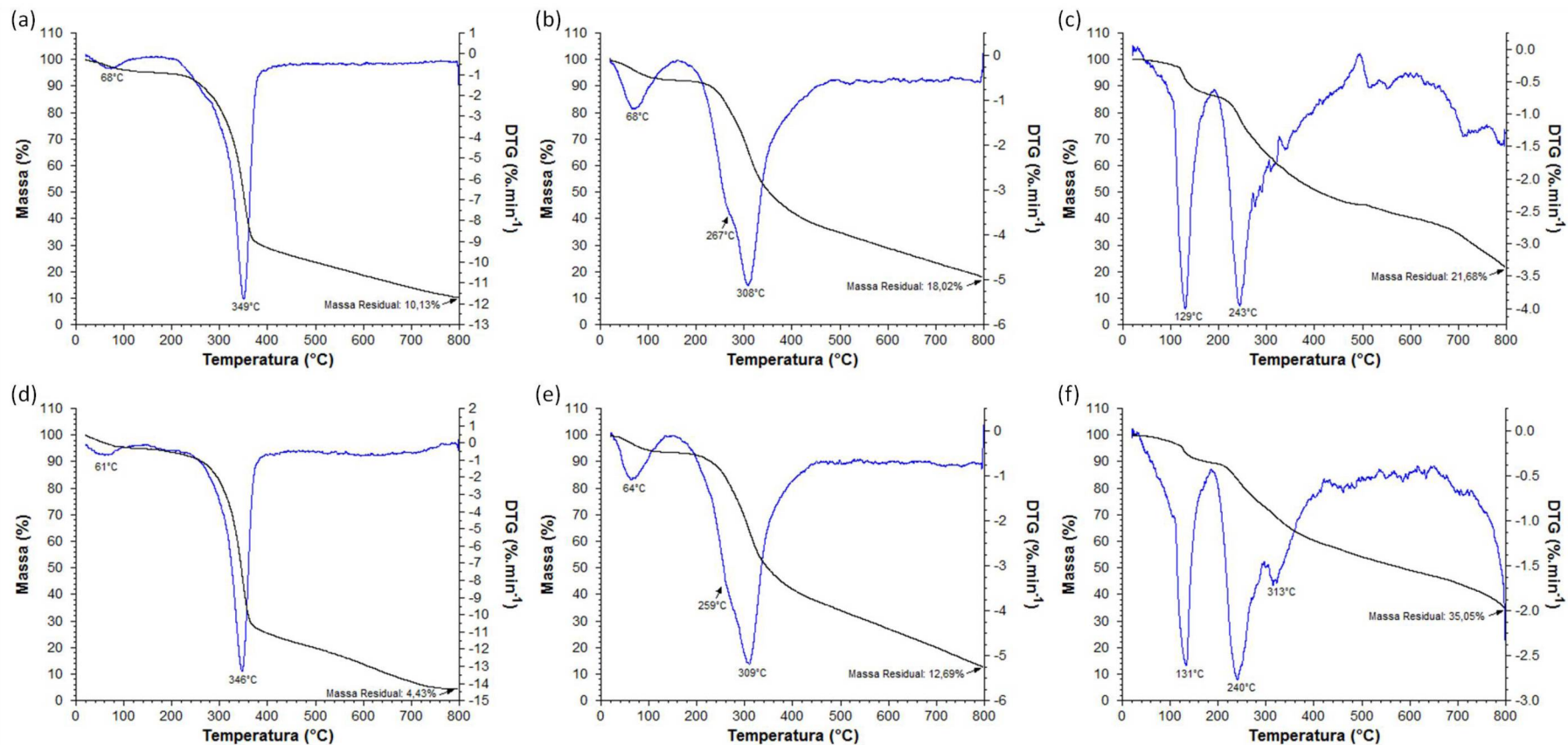
As curvas de TG e DTG para as frações CRd, CSr, CSe, DRd, DSr e DSe estão apresentadas na Figura 4.15. Observa-se alta semelhança entre as frações correspondentes aos mesmos grupos (resíduos, sobrenadantes e eluídos da diálise). Para as frações CRd e DRd (Figura 4.15a e d). Também são observados três estágios distintos e definidos de decomposição. O primeiro estágio ocorreu entre 20 e 150°C causando uma perda de massa de aproximadamente 5%, correspondendo à eliminação de água. O segundo estágio de decomposição ocorreu entre 151 e 390°C com perda de massa de aproximadamente 65%, correspondente à celulose identificada anteriormente por ressonância magnética nuclear. Resultados

similares para a degradação de celulose foram obtidos por Giudicianni, Cardone e Ragucci (2013) e Burhenne et al. (2013).

As curvas de TG e DTG para as frações CSr e DSr (Figura 4.15b e e) foram semelhantes às obtidas para a fração BSr. Observam-se três estágios de degradação. Um primeiro estágio de decomposição entre 20 – 150°C, com perda de massa equivalente a 8%; um segundo estágio entre 151 – 480°C, com perda de massa de aproximadamente 56% e um estágio final de degradação com perda de massa de aproximadamente 20%. No estágio dois de decomposição, observa-se um pico máximo de temperatura em 308°C, porém nota-se uma curvatura em aproximadamente 259°C. Comparando essas frações com amostras polissacarídicas e proteicas (Apêndice 1), infere-se que o pico de temperatura em 259°C corresponde à degradação da parte glicídica e o pico em 308°C corresponde à degradação da parte proteica. Estes resultados mostram que a parte glicídica destas frações são termicamente mais lábeis e decompõem primeiro em comparação às proteínas. Os dados obtidos estão em acordo com os trabalhos de Einhorn-Stoll, Kunzek e Dongowski (2007) e Einhorn-Stoll e Kunzek (2009) que encontraram picos máximos de degradação de pectinas em 250°C, e com o trabalho de Tian et al. (2010) que descreveu o início de degradação de proteínas de soja em 250°C com pico máximo em 300°C.

As curvas de TG e DTG para as frações CSe e DSe (Figura 4.15c e f) também apresentaram três estágios de degradação. Um primeiro estágio de decomposição entre 20-190°C, com perda de massa equivalente a 12%; um segundo estágio entre 191-490°C, com perda de massa de aproximadamente 40% e um estágio final de degradação entre 490-800°C com perda de massa de aproximadamente 24%. No segundo estágio de decomposição, observam-se dois picos máximos de temperatura, a 240 e 313°C correlacionados à sacarose. (EGGLESTON; TRASK-MORRELL; VERCELLOTTI, 1996).

FIGURA 4.15 - CURVAS DE TG E DTG PARA AS FRAÇÕES CRd (a), CSr (b), CSe (c), DRd (d), DSr (e) E DSe (f)



FONTE: O autor (2016).

As massas residuais de 21,68 e 35,05% para as frações CSe e DSe, respectivamente, indicam a presença de elementos inorgânicos. A diferença entre as massas residuais dos eluídos da diálise e os sobrenadantes dialisados para cada uma das extrações, 3,66% para a extração C e 22,36% para a extração D, mostram que a extração em pH 13,25 ocasionou a geração de uma quantidade de sal bastante superior à extração em pH 13,0. Contudo, deve-se considerar, que os elementos inorgânicos poderiam estar complexados com as moléculas orgânicas, levando em consideração a alta massa residual da fração CSr (18,02%), indicando que os mesmos não foram eliminados no processo de diálise. Ao corrigir os valores de carboidratos totais e proteínas para as frações CS e DS, 26 e 36,6% e 24,5 e 35,5%, respectivamente, nota-se então uma semelhança entre os resultados, semelhança ocultada inicialmente.

4.3.5 ANÁLISE PRÉVIA DE VIABILIDADE ECÔNOMICA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE FARELO DE SOJA

O processo de extração aqui descrito, objeto da patente nº BR1020120309106, foi combinado de maneira inédita, gerando produtos que apresentam alto potencial de adesão a enterobactérias. A fim de determinar a viabilidade econômica deste processo, estimativas de custos de produção foram realizadas considerando apenas a escala laboratorial, ignorando um escalonamento da produção. Para tanto, considerou-se as estimativas de custos com os principais insumos utilizados, bem como uma estimativa do consumo energético dos equipamentos envolvidos no processo.

Para estimar o consumo energético envolvido, foi considerado a potência e capacidade total dos principais equipamentos utilizados, a relação com o tempo de funcionamento e o custo da energia elétrica no estado do Paraná (Companhia Paranaense de Energia Elétrica - COPEL), sendo utilizado o valor/kWh tabelado para o ano de 2015 (R\$ 0,80) (Tabela 4.19). Para a determinação do consumo energético da secagem por liofilização foram consideradas todas as etapas e equipamentos utilizados como freezer, liofilizador e bomba de vácuo e, o valor final foi determinado pela soma desses processos unitários. Na etapa de congelamento, o produto permanece em freezer por 24 horas, gerando um gasto de energia de 1,2 kWh, e no período de 24 horas necessários para liofilização do material

(considerando um equipamento com potência de 6 kg de gelo/24 h) há um consumo de energia pelo liofilizador e bomba de vácuo de 36 kWh e 13,2 kWh, respectivamente, totalizando um gasto energético de 50,4 kWh.

TABELA 4.19 - ESTIMATIVA DE CONSUMO ENERGÉTICO DOS PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATOS DE FARELO DE SOJA

Equipamento	Potência (W)	Tempo de Utilização (h)	Consumo (kWh)
Autoclave (30 L)	2500	2,5	6,25
Centrífuga Refrigerada (5000 rpm)	1500	0,75	1,125
Osmose Reversa (produção de 10 L de água/h)	35	1	0,035
Liofilizador (6 kg de gelo/24 h)	2100	24	50,4
pHmetro	2	1	0,002
Agitador mecânico (cap. 10 L)	1050	1	1,05
Total (kWh)			58,862
Total Gasto (R\$)			47,08

FONTE: O autor (2016).

Considerando a condição otimizada de extração obtida neste estudo (pH: 13, tempo: 60 min e concentração do farelo de soja: 300 g·L⁻¹), para obtenção de 1 kg de extrato de farelo de soja, estima-se um custo de produção de R\$ 62,37 (Tabela 4.20). No entanto, o rendimento médio do processo para esta condição de extração, é aproximadamente 70% m/m, dessa forma o custo de produção final será R\$ 89,11/kg de extrato de farelo de soja. Este valor, em escala industrial pode ser significativamente reduzido, optando-se por processos mais econômicos, como por exemplo, substituição da etapa de liofilização por secagem em *spray dryer*. Além disso, a utilização de reagentes mais concentrados para ajuste do pH da solução, reduz a quantidade necessária destes insumos.

Produtos comerciais, que apresentam o mesmo potencial anti-adesão dos extratos obtidos neste trabalho, vêm sendo comercializados por aproximadamente US\$ 50/kg (R\$ 203,00; Taxa de Câmbio: R\$ 4,06). O resultado da estimativa de custo para obtenção dos extratos de soja de R\$ 90/kg, evidencia a viabilidade econômica do processo, indicando que os produtos gerados podem ser alternativos aos produtos comerciais já disponíveis, tanto em função do seu potencial biológico quanto pelo seu custo de produção.

TABELA 4.20 - ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA PRODUÇÃO DE 1 kg DE EXTRATO DE FARELO DE SOJA, UTILIZANDO A CONDIÇÃO OTIMIZADA C*

Material	Consumo	Custos (R\$)
Farelo de Soja	1 kg	1,15
Reagentes químicos (Ácido Clorídrico e Hidróxido de Sódio)	3,33 L/reagente	13,92
Consumo de Água	20 L	0,23
Consumo Energético com Equipamentos	58,862 kWh	47,08
	Total considerando rendimento de 100%	62,37
	Total considerando rendimento de 70%	89,11

NOTA: * Condição otimizada: pH:13, tempo: 60 min e concentração do farelo de soja: 300 g·L⁻¹.
 FONTE: O autor (2016).

4.4 CONCLUSÕES

Um delineamento experimental do tipo DCCR foi aplicado para otimizar as condições de extração em função do rendimento do processo e obtenção de extratos com alta capacidade de adesão a enterobactérias. A metodologia de superfície de resposta escolhida foi efetiva para estimar o efeito das variáveis pH, tempo (min) e concentração de farelo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e determinar os parâmetros ótimos de processo para as faixas estudadas.

O pH apresentou efeito significativo sobre ambas as respostas. Uma boa correlação foi observada entre os valores preditos pela equação polinomial e os valores determinados experimentalmente. Os melhores rendimentos (53,9 e 77,3%) e extratos com maiores atividades de adesão a enterobactérias (219,9 e 215,8%) foram obtidos em pH 0,5 e 13,0; tempo de 60 min e concentração de farelo de $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Extratos, obtidos a partir de farelo de soja, em pH 0,5; 1,3 e 13,0; quanto à sua capacidade de adesão a enterobactérias foram estatisticamente equivalentes ao produto comercial. A extração realizada em pH 13,25 apresentou excelente rendimento (87,8%), no entanto os extratos obtidos não apresentaram capacidade de adesão, sendo o único experimento que não acompanhou a previsão do modelo. A eliminação de sais e compostos de baixa massa, por diálise, concentra as moléculas bioativas, e aumenta significativamente a capacidade de adesão dos extratos, atingindo até 792,4% de capacidade de adesão em relação ao produto comercial.

Variação na concentração das frações CS e CSr (obtidas em pH 13) nos ensaios de capacidade de adesão evidenciam um comportamento dose dependente para a fração CSr, sendo necessário uma concentração de 0,46% m/v para aderir metade do máximo de bactérias. Estas mesmas frações apresentaram potencial de inibição, diferindo estatisticamente do controle negativo, inibindo em até 88,5% a adesão de *Salmonella enterica* a receptores conhecidos. Nenhuma das frações apresentou poder citotóxico sobre o patógeno, entre as concentrações estudadas. Adicionalmente, a capacidade de adesão dessas frações não foi afetada por processo de digestão *in vitro*.

A análise química das frações indica a presença de proteínas e carboidratos nas frações sobrenadantes. As frações resíduas derivadas de extração alcalina são compostas majoritariamente por celulose. As frações residuais, derivadas de

extrações ácidas, são compostas por celulose e proteínas, indicando que o processo gera precipitação de partes proteicas. Análises termogravimétricas dos eluídos em diálise de todas as frações indicam a presença de sacarose.

A extração em pH 13,25 gerou 22% de sal durante o processo de neutralização, valor bem superior quando comparado com as extrações realizadas em pH 13,0 (4%) e 1,3 (14%). Não foi possível, por meio das metodologias utilizadas, diferenças importantes entre as frações extraídas em pH 13,0 e 13,25 que permitissem justificar a redução da capacidade de adesão do último extrato. No entanto, sugere-se que a alta força iônica gerada pelos sais resultantes da neutralização pode ter ocasionado a precipitação de moléculas biotivas importantes. Mais estudos são necessários para confirmação dessa hipótese.

Estimativas de custos de produção indicam que o processo para obtenção de extratos bioativos de farelo de soja além de inovador é tecnicamente e economicamente viável, uma vez que seu preço final de produção gira em torno de R\$90/kg de extrato de farelo de soja.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, P. W.; BRERETON, R. G. Experimental design II. Optimization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 63-70, 1996.
- BECKER, P. M. et al. Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2686-2696, 2007.
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.
- BOISEN, S.; FERNÁNDEZ, J. A. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. **Animal Feed Science and Technology**, v. 68, n. 3-4, p. 277-286, 1997.
- BURHENNE, L. et al. The effect of the biomass components lignin, cellulose and hemicellulose on TGA and fixed bed pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 101, p. 177-184, 2013.
- CARNACHAN, S. M. et al. Effects of simulated digestion *in vitro* on cell wall polysaccharides from kiwifruit (*Actinidia* spp.). **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 132-139, 2012.
- CHIVERO, P. et al. Physical properties of oil-in-water emulsions as a function of oil and soy soluble polysaccharide types. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 34-40, 2014.
- CONDE, E. et al. Extraction of natural antioxidants from plant foods. In: RIZVI, S. S. H. (Ed.). **Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 506-594.
- DENG, N.; ZHANG, Y.F.; WANG, Y. Thermogravimetric analysis and kinetic study on pyrolysis of representative medical waste composition. **Waste Management**, v. 28, n. 9, p. 1572-1580, 2008.
- DIPTEE, R. et al. Application of response surface methodology in protein extraction studies from brewer's spent grain. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 13, n. 6, p. 457-474, 1989.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- DUDLEY, R. L. et al. High-resolution carbon-13 CP/MAS NMR spectra of solid cellulose oligomers and the structure of cellulose II. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 8, p. 2469-2472, 1983.
- DUTTA, B. K. **Principles of mass transfer and separation processes**. New Delhi: PHI Learning Pvt., 2007.

EGGLESTON, G.; TRASK-MORRELL, B. J.; VERCELLOTTI, J. R. Use of differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis to characterize the thermal degradation of crystalline sucrose and dried sucrose-salt residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 3319-3325, 1996.

EINHORN-STOLL, U.; KUNZEK, H. Thermoanalytical characterisation of processing-dependent structural changes and state transitions of citrus pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 40-52, 2009.

EINHORN-STOLL, U.; KUNZEK, H.; DONGOWSKI, G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1101-1112, 2007.

FACKLER, K.; SCHWANNINGER, M. How spectroscopy and microspectroscopy of degraded wood contribute to understand fungal wood decay. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 587-599, 2012.

FASOLIN, L. H. A. C. R. L. Characterisation of soy extract processed under different drying methods and extraction conditions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 3, p. 503-511, 2013.

FAVERI, D. D. et al. Statistical investigation on the effects of starting xylose concentration and oxygen mass flowrate on xylitol production from rice straw hydrolyzate by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 65, n. 3, p. 383-389, 2004.

FERREIRA, V. F.; SILVA, F. C.; PERRONE, C. C. Sacarose no laboratório de química orgânica de graduação. **Química Nova**, v. 24, p. 905-907, 2001.

FESSELE, C.; LINDHORST, T. K. Effect of aminophenyl and aminothiahexyl alpha-D-glycosides of the manno-, gluco-, and galacto-series on type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli*. **Biology (Basel)**, v. 2, p. 1135-1149, 2013.

FILISSETTI-COZZI, T. M.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157-162, 1991.

FURUTA, H. et al. **Production of water-soluble polysaccharide**: Fuji Oil Co Ltd. JP10036405 1996.

FURUTA, H.; TAKAHASHI, T.; TOBE, J.; KIWATA, R. et al. Extraction of water-soluble soybean polysaccharides under acidic conditions. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 12, p. 2300-2305, 1998.

FURUTA, H.; TAKAHASHI, T.; TOBE, J.; MOMEN, R. **Water soluble soybean polysaccharide and its production and use thereof**. JPH11279203, Out. 12, 1998.

GAN, C.-Y.; ABDUL MANAF, N. H.; LATIFF, A. A. Optimization of alcohol insoluble polysaccharides (AIPS) extraction from the *Parkia speciosa* pod using response surface methodology (RSM). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 825-831, 2010.

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 Microbiology Methods**, v. 83, n. 2, p. 168-74, 2010.

GIUDICIANNI, P.; CARDONE, G.; RAGUCCI, R. Cellulose, hemicellulose and lignin slow steam pyrolysis: thermal decomposition of biomass components mixtures. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 100, p. 213-222, 2013.

GONZALEZ-ORTIZ, G. et al. Screening of extracts from natural feed ingredients for their ability to reduce enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 adhesion to porcine intestinal epithelial cell-line IPEC-J2. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 494-499, 2013.

_____. Screening the ability of natural feed ingredients to interfere with the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 to the porcine intestinal mucus. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 633-642, 2014.

GROOT, J. C. J. et al. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 77-89, 1996.

GUO, F. et al. Surface properties of heat-induced soluble soy protein aggregates of different molecular masses. **Journal Food Science**, v. 80, n. 2, p. C279-C287, 2015.

GUO, J. et al. Limited aggregation behavior of β -conglycinin and its terminating effect on glycinin aggregation during heating at pH 7.0. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3782-3791, 2012.

GUO, X.; ZOU, X.; SUN, M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius*. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 344-349, 2010.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

HUA, Y. et al. **Membrane method for preparing pectic substance soybean water-soluble polysaccharide in grades**. CN101880336, Nov. 10, 2010.

HUR, S. J. et al. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

HURTTA, M.; PITKÄNEN, I.; KNUUTINEN, J. Melting behaviour of D-sucrose, D-glucose and D-fructose. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 13, p. 2267-2273, 2004.

JATOBÁ, S. S. **Processo para a produção de extrato aquoso de soja**. PI9600244-1, Jan. 29, 1996.

JEON, Y.-J.; PARK, P.-J.; KIM, S.-K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 1, p. 71-76, 2001.

JIANG, J.; CHEN, J.; XIONG, Y. L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7576-7583, 2009.

JIANG, J.; XIONG, Y. L.; CHEN, J. pH Shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8035-8042, 2010.

KEALLEY, C. S. et al. Structure and Molecular Mobility of Soy Glycinin in the Solid State. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2937-2946, 2008.

KINSELLA, J. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, n. 3, p. 242-258, 1979.

KONO, H. et al. CP/MAS ¹³C NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 1. Complete assignment of the CP/MAS ¹³C NMR spectrum of the native cellulose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 25, p. 7506-7511, 2002.

LABAVITCH, J. M.; FREEMAN, L. E.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant cell walls. Purification and characterization of a β -1,4-galactanase which degrades a structural component of the primary cell walls of dicots. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 19, p. 5904-5910, 1976.

LI, X. et al. Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1410-1417, 2007.

LINGYUN, W. et al. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 3, p. 1087-1093, 2007.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MA, F. Q. **Process for preparing water soluble soybean polysaccharide with bean pulp and bean dreg as raw materials**. CN1827651, Set. 6, 2006.

MA, L. et al. Selective chemical modification of soy protein for a tough and applicable plant protein-based material. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 26, p. 5241-5248, 2015.

MADDI, B.; VIAMAJALA, S.; VARANASI, S. Comparative study of pyrolysis of algal biomass from natural lake blooms with lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 11018-11026, 2011.

MANTLE, M.; HUSAR, S. D. Adhesion of *Yersinia enterocolitica* to purified rabbit and human intestinal mucin. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 6, p. 2340-2346, 1993.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MIAO, J. et al. Quaternary ammonium acetate: an efficient ionic liquid for the dissolution and regeneration of cellulose. **RSC Advances**, v. 4, n. 69, p. 36721-36724, 2014.

MIZUNO, A. et al. Relationship between the glass transition of soy protein and molecular structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3292-3297, 2000.

MONRO, J. A.; MISHRA, S.; VENN, B. Baselines representing blood glucose clearance improve *in vitro* prediction of the glycaemic impact of customarily consumed food quantities. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 2, p. 295-305, 2010.

MONTES, R. et al. Chemometrical experimental design-based optimization studies in capillary electrophoresis applications. In: HANRAHAN, G.; GOMEZ, F. A. (Ed.). **Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p. 75-91.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. **Food & Function**, v. 1, n. 1, p. 32-59, 2010.

MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MORITA, M. Polysaccharides of soybean seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 564-573, 1965.

NAKAMURA, A. et al. Characterization and functional properties of soybean high-molecular-mass polysaccharide complex. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 75-84, 2012.

NAKAO, Y.; MIYASHITA, K.; TODA, J. **Process for preparing soybean polysaccharides**. US4119435, Out. 10, 1978.

NAYAK, P. et al. Synthesis and characterization of soy protein isolate/mmt nanocomposite film for the control release of the drug ofloxacin. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 1, n. 2, p. 27-36, 2011.

NO, H. K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 65-72, 2002.

NOGUCHI, K.; SHIKANUMA, S. **Manufacture Of Polysaccharide Containing Uronic Acid**. JP10036404, Fev. 10, 1996.

NOSEDA, M. D. et al. **Extrato de farelo de soja como inibidor bacteriano e processo para produção do mesmo**. BR1020120309106, Dez. 4, 2012.

OETTING, L. L. et al. Efeitos de antimicrobianos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal e a frequência de diarreia em leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2013-2017, 2006.

OLD, D. C.; DUGUID, J. P. Selective outgrowth of fimbriate bacteria in static liquid medium. **Journal of Bacteriology**, v. 103, n. 2, p. 447-456, 1970.

OPELLA, S. J.; FREY, M. H.; CROSS, T. A. Detection of individual carbon resonances in solid proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 19, p. 5856-5857, 1979.

PASEEPHOL, T.; SMALL, D.; SHERKAT, F. Process optimisation for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 73-80, 2007.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 13, n. 3, p. 268-277, 1996.

QI, J. **Method for using membrane separation and classification to prepare soybean polysaccharides with different molecular weights**. CN101693746, Abr. 14, 2010.

QUANHONG, L.; CAILI, F. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. **Food Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 701-706, 2005.

ROBERTS, C. L. et al. Soluble plantain fibre blocks adhesion and M-cell translocation of intestinal pathogens. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 97-103, 2013.

RODRIGUES, J. M. **Capacidade de ligação *in vitro* à bactérias enteropatógenicas dos extratos isolados de farelo de soja**. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2ª. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SNELLINGS, N. J.; TALL, B. D.; VENKATESAN, M. M. Characterization of *Shigella* type 1 fimbriae: expression, FimA sequence, and phase variation. **Infection Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2462-2467, 1997.

SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R.; ANON, M. C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2471-2479, 1995.

TANG, C.-H.; CHOI, S.M.; MA, C.Y. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 2, p. 96-104, 2007.

THAKUR, V. K. et al. PMMA-g-SOY as a sustainable novel dielectric material. **RSC Advances**, v. 4, n. 35, p. 18240-18249, 2014.

TIAN, K. et al. Kinetics of thermally-induced conformational transitions in soybean protein films. **Polymer**, v. 51, n. 11, p. 2410-2416, 2010.

TU, Z. et al. **Method of preparing soluble soybean polysaccharide**. CN101671400, Mar. 17, 2010.

VAN DER KLIS, J. D.; KWAKERNAAK, C. Proving a concept: An *in vitro* approach. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 23, n. 2, p. 301-305, 2014.

VASCONCELLOS, F. C. S. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of beta-conglycinin and glycinin from soy protein isolate. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 3, n. 8, p. 144-157, 2014.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 999-1004, 2002.

WAGNER, J. R.; SORGENTINI, D. A.; ANON, M. C. Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3159-3165, 2000.

WANG, Z. et al. Relationship between Secondary Structure and Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate Subjected to Heat Treatment. **Journal of Chemistry**, v. 2014, p. 10, 2014.

WOLF, W. J. Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 969-976, 1970.

XIA, Y. et al. Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf by Box–Behnken statistical design and its anti-complement activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 282-291, 2011.

XIONG, X. et al. Effects of alkali treatment and subsequent acidic extraction on the properties of soybean soluble polysaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 239-247, 2015.

YAMAGUCHI, F. et al. **Production of water-soluble polysaccharide**. JP06256402, Set. 13, 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, n. 4, p. 265-273, 1996.

YE, C.-L.; JIANG, C.J. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 495-502, 2011.

YUAN, Y. J. et al. Effect of pH and Ca²⁺-induced associations of soybean proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4953-4958, 2002.

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

ZHENG, H.-G. et al. Preparation of soluble soybean protein aggregates (SSPA) from insoluble soybean protein concentrates (SPC) and its functional properties. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 154-164, 2008.

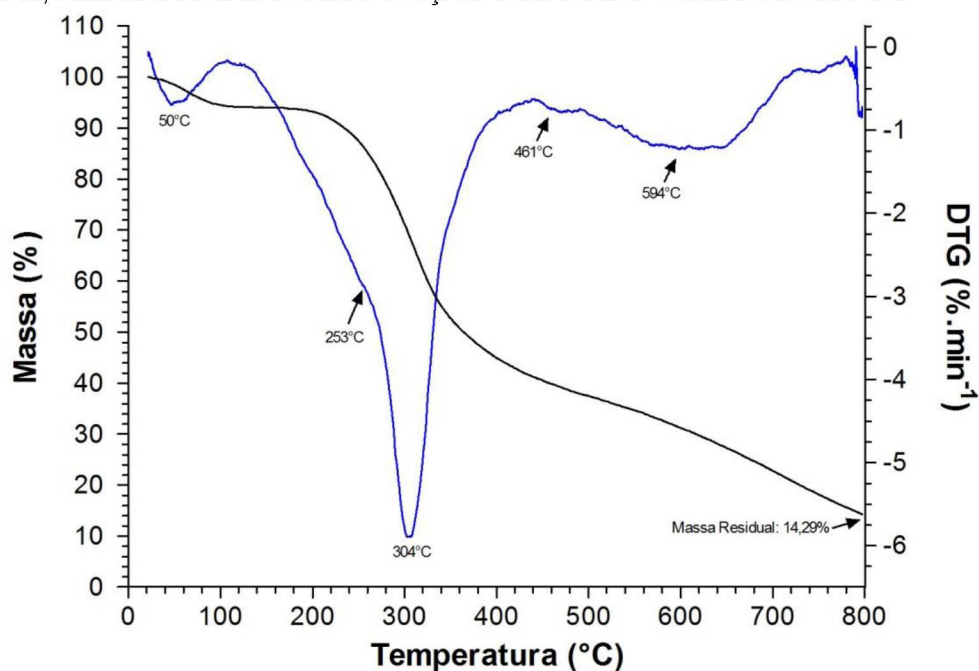
ZHENG, L.-Y.; ZHU, J.-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.

ZOU, Y. et al. Response surface methodology for optimization of the ultrasonic extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* Nannf.var.modesta L.T.Shen. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 503-508, 2011.

APÊNDICE 1

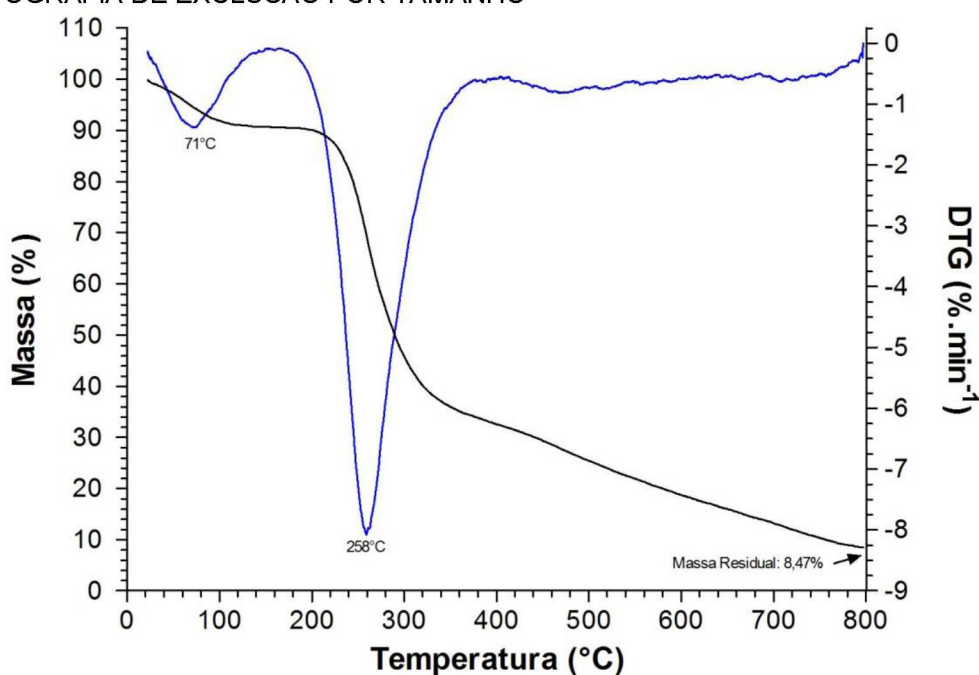
CURVAS DE TG E DTG PARA FRAÇÕES DE FARELO DE SOJA OBTIDAS EM pH 2,0

FIGURA 4.16 - CURVAS DE TG E DTG PARA A FRAÇÃO FS-Tp, CONTENDO 84,6% DE PROTEÍNAS, RESULTANTE DA PRECIPITAÇÃO COM ÁCIDO TRICLOROACÉTICO



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 4.17 - CURVAS DE TG E DTG PARA UMA PECTINA (FRAÇÃO FS-EpA), OBTIDA APÓS CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO



FONTE: O autor (2016).

2. CONCLUSÃO GERAL

O processo de extração (tratamento termoquímico do farelo de soja) utilizado permitiu a obtenção de uma fração bruta (FS-Ep) que apresenta alto teor de carboidratos e baixo teor de proteínas. Seu fracionamento mostrou a presença de dois grupos de moléculas: Pectinas parcialmente despolimerizadas de alta massa molar ($M_w \cong 500$ kDa), 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; e um segundo grupo, composto majoritariamente por β -D-galactanas-(1→4)-ligadas de baixa massa molar ($M_w \cong 9$ kDa). Esses polissacarídeos não ocorrem naturalmente, são resultados do processo termoquímico aplicado ao farelo de soja.

Todas as frações obtidas, com exceção da pectina despolimerizada purificada, apresentaram capacidade de adesão a enterobactérias semelhante ao produto comercial. Os resultados indicam que a presença de manose não é o único fator responsável pela ligação da bactéria às moléculas de interesse, outros fatores/biomoléculas participam do processo de adesão.

Aplicação de delineamento experimental do tipo DCCR permitiu otimização das condições de extração em função do rendimento do processo e obtenção de extratos com alta capacidade de adesão a enterobactérias. A otimização elevou o rendimento dos extratos brutos em 10x, passando de 7,9% (extrato bruto FS-A, antes da otimização) para 77,3% (extrato CS). Os melhores rendimentos e extratos com maiores atividades de adesão a enterobactérias foram obtidos em pH 0,5, 60 min e [farelo] de 300 g.L⁻¹ e pH 13,0, 60 min e [farelo] de 300 g.L⁻¹. Análises indicam a presença de proteínas e carboidratos nos extratos biologicamente ativos. Adicionalmente, resultados demonstram que os extratos de farelo de soja mantêm atividade após processo de digestão, bem como apresentam potencial de inibir a adesão de enterobactérias a receptores análogos conhecidos.

O desenvolvimento de compostos que mimetizam os receptores celulares da mucosa intestinal, impedindo a adesão de enterobactérias e permitindo a eliminação dos agentes patogênicos, sem gerar resistência, é vista como uma estratégia promissora frente ao contexto do aumento da incidência de cepas resistentes a antibióticos em todo o mundo. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial econômico e biotecnológico dos extratos quimiotransformados de farelo de

soja na prevenção de infecções causadas por enterobactérias, podendo atuar como alternativas aos produtos já existentes. As consequências esperadas ao seu uso é a redução do uso de antibióticos na pecuária.

3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As metodologias utilizadas no presente trabalho não permitem avaliar o mecanismo exato de adesão entre os extratos de farelo de soja e as bactérias. A aplicação de técnicas de biologia molecular e superfície de ressonância de plasma podem fornecer informações relevantes e mais íntimas a respeito das interações biomoleculares envolvidas nesse processo. Avaliação da capacidade de adesão com patógenos portadores de fímbrias específicas pode auxiliar na correlação estrutura-atividade biológica. Adicionalmente, experimentos *in vitro* de inibição da adesão de patógenos utilizando células intestinais, podem fornecer informações mais próximas dos resultados obtidos *in vivo*. Estudos para determinação do caráter prebiótico dos extratos de farelo de soja podem acrescentar informações quanto ao potencial de modulação intestinal. Experimentos utilizando animais desafiados poderão contribuir para validação do potencial de adesão dos extratos de farelo de soja, além de fornecer informações importantes ao nível imunológico.

Os resultados de otimização do processo permitiram identificar duas zonas ótimas de extração de extratos bioativos, no entanto distantes entre si e próximas aos limites axiais avaliados. A execução de dois novos delineamentos, minimizando as faixas de estudo, podem trazer informações relevantes quanto à interação entre as variáveis estudadas, além de predizer com maior clareza as condições operacionais mais adequadas. Adicionalmente, experimentos de caracterização fina dos componentes extraídos sobre condições alcalinas podem ser realizados, uma vez que apenas os extratos obtidos em condições ácidas foram estudados mais profundamente. Esses estudos podem fornecer dados que auxiliem na relação estrutura atividade, bem como permitir comparações entre as condições de extração.

REFERÊNCIAS GERAIS

BECKER, P. M.; GALLETI, S. Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 11, p. 2026-2035, 2008.

BECKER, P. M. et al. Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2686-2696, 2007.

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

_____. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 311-315, 2002.

NEESER, J.-R.; WURSCH, P. **Glycopeptide and oligosaccharide antibacterial compositions**. US4939123, Jul. 3, 1990.

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. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 2, p. 428-436, 1986.

NOSEDA, M. D. et al. **Extrato de farelo de soja como inibidor bacteriano e processo para produção do mesmo**. BR1020120309106, Dez. 4, 2012.

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.

RODRIGUES, J. M. **Capacidade de ligação *in vitro* à bactérias enteropatogênicas dos extratos isolados de farelo de soja**. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.