



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA**  
**ALIMENTOS, DIETÉTICA E BIOQUÍMICA APLICADA À NUTRIÇÃO**

**REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PARA O**  
**ISOLAMENTO DE BETA GLUCANA E AVALIAÇÃO DA**  
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**NEVILDE MARIA RISELO SALES**

**Brasília, Outubro de 2017**



NEVILDE MARIA RISELO SALES

REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PARA O ISOLAMENTO  
DE BETA GLUCANA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - UnB como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima Grossi de Sá

Coorientadora: Professora Dr.<sup>a</sup> Marina Kiyomi Ito

Brasília, Outubro de 2017

REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL PARA O ISOLAMENTO  
DE BETA GLUCANA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

BANCA EXAMINADORA

Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima Grossi de Sá  
Cenargen/EMBRAPA-DF (orientadora)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Kiyomi Ito  
PPGNUT/UnB (coorientadora)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Wilma Maria Coelho Araújo  
PPGNUT/UnB (avaliadora)

Dr.<sup>a</sup> Angelina Maria Moreschi Basso  
Cenargen/EMBRAPA-DF (avaliadora)

Dr.<sup>a</sup> Loiane Alves de Lima  
UCB – Brasília/DF (suplente)

**RESUMO:** Uma crescente preocupação com os danos ao meio ambiente iniciou-se em 1960, que culminou em um grande impacto nas décadas seguintes e atualmente é um assunto de relevância e repercussão na sociedade mundial. A Organização das Nações Unidas incentiva projetos que visam a redução e reutilização de rejeitos orgânicos ou não e uma das propostas é a reutilização destes por meio do emprego de metodologias biotecnológicas economicamente viáveis para sua utilização. Dentre as categorias de resíduos sólidos orgânicos destacam-se os domiciliares e os agroindustriais, uma vez que geram um grande volume de resíduos. Durante o processo de produção de um fertilizante, ocorre a produção de um rejeito sólido que poderia conter o carboidrato  $\beta$ -glucana em sua composição. Este polissacarídeo está presente em fungos, bactérias e cereais e, devido às suas propriedades bioativas, é utilizado na prevenção e tratamento de doenças como dislipidemias, diabetes e câncer, assim como atua no sistema imune auxiliando no combate a patógenos como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Neste contexto, o presente estudo propõe o desenvolvimento de uma metodologia simples e de baixo custo para obtenção de  $\beta$ -glucana ativa oriunda de um resíduo agroindustrial denominado Fração II. Para a extração, procedimentos físicos e químicos foram utilizados e após a purificação e a quantificação enzimática obteve-se 7,3 gramas de glucanas totais e destas, 6,9 gramas foram de  $\beta$ -glucanas e 0,4 gramas de  $\alpha$ -glucanas. As análises de ressonância magnética nuclear corroboraram com os resultados obtidos indicando espectros característicos dos polissacarídeos previamente observados. Para avaliar a atividade biológica do carboidrato, um ensaio anti-proliferativo foi feito e resultados equivalentes aos relatados na literatura foram observados nos ensaios, evidenciando uma inibição de crescimento bacteriano com valores estatisticamente significativos ( $p < 0,0005$ ) nas cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O presente trabalho demonstrou que a metodologia desenvolvida foi eficaz e de baixo custo no isolamento de  $\beta$ -glucanas biologicamente ativas e que a Fração II pode ser utilizada para obtenção destes polissacarídeos.

**Palavras-chaves:** reaproveitamento de resíduos, metodologia de extração,  $\beta$ -glucanas.

**ABSTRACT:** In 1960, a concern for environmental damage began, which culminated in a major impact in the 1970s and is currently a subject of relevance and repercussion in world society. The United Nations encourages projects and programs aimed at the reduction and reuse of organic waste. One of the widespread proposals on the reuse of these is the use of economically viable biotechnological methodologies and products for their use. Among the categories of organic solid waste are the domiciliary and agro-industrial ones, due to the large volume generated. In the process of producing a fertilizer, in a Brazilian agro-industry, the production of a residue that, hypothesis, would have the  $\beta$ -glucan carbohydrate. This polysaccharide is present in fungi, bacteria and cereals and due to its bioactive properties, it is used in the prevention and treatment of diseases such as dyslipidemias, diabetes and cancer, as well as it acts in the immune system helping to fight against pathogens such as Gram-negative bacteria and Gram -positive. In this context, the present study proposes the development of a simple and low-cost methodology to obtain active  $\beta$ -glucan from an agro-industrial residue called Fraction II. Physical and chemical procedures were used for the extraction and purification and the enzymatic quantification measured a yield of 7.3 grams of total glucans and of these, 6.9 grams were  $\beta$ -glucans and 0.4 grams  $\alpha$ -glucans. The  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR analyzes corroborated the results obtained in the enzymatic quantification showing spectra characteristic of these polysaccharides. To evaluate the biological activity, an antibacterial assay was performed and results equivalent to those reported in the literature were observed, evidencing an inhibition of bacterial growth with statistically significant values ( $p < 0.0005$ ) in the strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The present work demonstrated that the methodology developed was efficient in the extraction and purification of the macromolecules and that the Fraction II can be used as raw material to obtain biologically active  $\beta$ -glucans.

**Keywords:** Reuse of residues, extraction methodology,  $\beta$ -glucans.

## EPÍGRAFE

A ignorância, muitas vezes, traz consigo a felicidade.

## DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Stanley Andreato Sales pelo apoio e carinho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora.

A meu esposo Stanley que esteve ao meu lado, mesmo nos momentos de profundo estresse.

A minha amada família pelas orações e apoio.

A minha orientadora, professora Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima Grossi de Sá, EMBRAPA/Cenargen – Brasília/DF

A minha Coorientadora, professora Dr.<sup>a</sup> Marina K. Ito, Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana-UNB – Brasília/DF

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Fernandes Arruda, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana-UNB/DF

Dr.<sup>a</sup> Patrícia Barbosa Pelegrini, Diagene Biotechnology – Brasília/DF

Dr.<sup>a</sup> Angelina Maria Moreschi Basso, Cenargen/EMBRAPA – Brasília/DF

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Wilma Maria Coelho Araújo, Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana-UNB – Brasília/DF

Dr.<sup>a</sup> Loiane Alves de Lima, UCB – Brasília/DF

Professora Dr.<sup>a</sup> Aline Lima de Oliveira, CAIQ/UNB – Brasília/DF

Dr.<sup>a</sup> Glogerley Tatiana S. Lust, Data & Statistics Analyst, Cargill Animal Nutrition, Minnesota/USA.

Prof. MSc. Luiz Eduardo Celino Benedito, CAIQ/UNB – Brasília/DF

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Susana Elisa Moreno, Universidade Católica de Campo Grande – Campo Grande/MS

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Rosechrer Carbonero – Universidade Federal de Goiás-Catalão/GO

Doutoranda Reneida Mendes, Cenargen/EMBRAPA – Brasília/DF

Sr. Leandro Anversa, ImmunoLife/Carbom Brasil – Formosa/GO

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana-UnB, Brasília/DF

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Católica de Brasília

A EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen-DF).

Enfim, a todos que me incentivam e/ou colocaram pedras em meu caminho. Peço a Deus que, em sua sabedoria infinita, dê a cada um em dobro tudo o que desejaram a mim.



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Origem, estruturas, tipo de ligações $\beta$ -glicosídicas e tipo de fibra dietética-----	20
<b>Tabela 2.</b> Estimativa de massa molecular (atômica) de algumas $\beta$ -glucanas-----	21
<b>Tabela 3:</b> Rendimento das $\beta$ -glucanas em 100g de produto <i>in natura</i> -----	23
<b>Tabela 4.</b> Principais utilidades das $\beta$ -glucanas nas indústrias alimentícia e farmacêutica-----	24
<b>Tabela 5.</b> Fibras solúveis e insolúveis, principais fontes, tipos e benefícios-----	26
<b>Tabela 6.</b> Alguns estudos com $\beta$ -glucanas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> : dosagens e efeitos-----	29
<b>Tabela 7.</b> Algumas patentes provenientes da extração e utilização de $\beta$ -glucanas-----	32
<b>Tabela 8.</b> Média de preços de produtos ricos em $\beta$ -glucanas ou de $\beta$ -glucanas purificadas disponíveis no mercado-----	33
<b>Tabela 9.</b> Comparação entre macro e micronutrientes da Fração II e a batata-----	38

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Diferenças entre a conformação de moléculas cíclicas de carboidratos na forma $\alpha$ (Cis) e $\beta$ (Trans) -----	17
<b>Figura 2:</b> Estrutura das moléculas do tipo $\alpha$ -glucanas (1,4) e (1,6) -----	18
<b>Figura 3:</b> Divisão dos polissacarídeos como amidos e não amidos e classificação das $\beta$ -glucanas -----	19
<b>Figura 4:</b> Estrutura de $\beta$ -glucana com ligações glicosídicas do tipo (1,3) -----	21
<b>Figura 5:</b> Estrutura de $\beta$ -glucana com ligações glicosídicas do tipo (1,4) -----	22
<b>Figura 6:</b> Estrutura de $\beta$ -glucana com ligações glicosídicas do tipo (1,3)- (1,4)-----	22
<b>Figura 7:</b> Estrutura de $\beta$ -glucana com cadeias ramificadas do tipo (1,3)-(1,6)-----	23
<b>Figura 8:</b> Processo de produção do fertilizante do qual se oriunda a Fração II-----	37

## SUMÁRIO

<b>1.0 APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.0 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 GLUCANAS .....	17
2.2 ALFA-GLUCANAS .....	18
2.3 BETA-GLUCANAS .....	19
<b>2.3.1 Definição .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2 Estrutura molecular .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.3 Principais aplicações das <math>\beta</math>-glucanas .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.4 Atividade biológica das <math>\beta</math>-glucanas e os benefícios à saúde .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.5 Atividade biológica das <math>\alpha</math>-glucanas e benefícios à saúde .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3.6 Protocolos de extração e purificação e patentes das <math>\beta</math>-glucanas .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3.7 Valor comercial das <math>\beta</math>-glucanas .....</b>	<b>33</b>
2.4 PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO II .....	35
2.4.1 Origem da batata .....	35
2.4.1 Reaproveitamento .....	36
2.4.2 Origem da Fração II .....	37
2.4.3 Composição nutricional da Fração II .....	38
<b>3.0 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>40</b>
<b>4.0 OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>5.0 METODOLOGIA .....</b>	<b>42</b>
5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS DO TIPO B-GLUCANAS ...	42
<b>5.1.1 Metodologia desenvolvida .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1.2 Remoção de lipopolissacarídeo (LPS) .....</b>	<b>43</b>
5.2 QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DAS MOLÉCULAS PURIFICADAS .....	43
5.3 CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULAS POR RMN .....	44
5.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	45

5.5 ESTATÍSTICA.....	46
<b>6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>
<b>7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
7.1 ARTIGO .....	61
<b>8.0 CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>9.0 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>84</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>85</b>
10.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	85

## LISTA DE ABREVIACÕES

AACC - *American Association for Clinical Chemistry*

ABBA - Associação Brasileira da Batata

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

$\alpha$  – Símbolo alfa

$\beta$  – Símbolo beta

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CET - Cromatografia de Exclusão de Tamanho

CR3 Receptor do sistema complemento-3

Dec-1 - Dectina-1

D<sub>2</sub>O - Água deuterada

DCNTs – Doenças crônicas não transmissíveis

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

g – grama (medida de massa)

HCl – Ácido clorídrico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICC - *International Association for Cereal Science and Technology*

IL - Interleucinas

IL1 - Interleucina-1

kDa - KiloDaltons (unidade de massa atômica, 1Da equivale a  $1.660539040(20) \times 10^{-27}$

kg - quilogramas

KOH - Hidróxido de potássio

L - Litro

mL – mililitro

$\mu$ L – micro litro

mM - micro molar

°C - grau Celsius

pH - Potencial Hidrogeniônico

PRRs - *Pattern recognition receptors*

PSA - Antígeno Prostático Específico

<sup>13</sup>C RMN - Ressonância Magnética Nuclear com marcação do carbono 13

<sup>1</sup>H RMN - Ressonância Magnética Nuclear com marcação do hidrogênio

rpm - Rotações por minuto

TLR-2 - *Toll like receptor-2*

TLR2/6 - *Toll-like 2 e 6*

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral

## 1.0 APRESENTAÇÃO

Estudos da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) demonstraram que 1,3 bilhões de toneladas de alimentos são perdidos por ano no mundo. Essa perda equivale a, aproximadamente, um terço do total da produção de alimentos e gera um prejuízo em torno de 750 bilhões de dólares/ano. As frutas e hortaliças são os principais contribuintes para o alto custo econômico dos alimentos desperdiçados, cujo valor é de 23% do custo total (FAO, 2016).

No Brasil algumas iniciativas no reaproveitamento de alimentos são notáveis, dentre estas ações destaca-se o programa Mesa Brasil que, além de recolher alimentos não atrativos para o comércio, faz uma pré-seleção e distribuição destes às instituições que auxiliam pessoas carentes (Sabio et al., 2015). Outro projeto importante é o Festival Disco Xepa, que reúne “chefs” de renome para produzir pratos “gourmet” utilizando alimentos que seriam descartados por não terem valor comercial. O grupo *Carrefour* por sua vez, implantou o projeto *Sans Form* utilizando o lema "Qualidade além da aparência". Este visa incentivar a compra de frutas e legumes que apresentam defeitos, como tamanho menor que o padrão, mas que ainda mantém boa qualidade para consumo (Sabio et al., 2015).

Atualmente, dos mais de três milhões de toneladas de batatas produzidas no Brasil, por ano, cerca de 30% desta produção é descartada por não ter valor comercial agregado, correspondendo a mais de um milhão de toneladas/ano. São batatas com pequenos defeitos, tais como danos causados durante o processo de transporte, métodos de colheita e armazenamento, e que resultam na rejeição do consumidor (A.B.B.A., 2016).

Uma agroindústria brasileira utiliza estas batatas descartadas para a produção de um adubo foliar. Em uma das etapas de produção deste fertilizante, ocorre a produção de um rejeito sólido (neste projeto denominado de “Fração II”) que é descartado na natureza. Estudos prévios (não demonstrados, em processo de patente) indicam uma possível presença de moléculas do tipo  $\beta$ -glucanas neste resíduo sólido.

As moléculas de  $\beta$ -glucanas são polissacarídeos não amiláceos, constituídos por unidades de glicose. Baseando-se nas ligações do carbono anomérico podem ser classificadas como  $\beta$ -glucanas (1,3),  $\beta$ -glucanas (1,3)-(1,4) ou, ainda,  $\beta$ -glucanas (1,3)-(1,6) (Vaclav & Miroslav, 2013). Esse polissacarídeo se destaca entre os compostos bioativos, uma vez que estudos demonstraram o papel importante do mesmo na prevenção

de várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), tais como dislipidemias, diabetes e câncer (Vaclav, 2009; Vaclav & Miroslav, 2013). Estas moléculas também atuam no sistema imunológico agindo como um modulador e auxiliando no combate a infecções oportunistas, como as causadas por bactérias, fungos e parasitas (Vaclav & Miroslav, 2013; Beta Glucan Org, 2016). As metodologias utilizadas para a extração e purificação das  $\beta$ -glucanas ainda são onerosas o que, conseqüentemente, eleva o preço final de mercado de amostras purificadas e biologicamente ativas (Zhu et al., 2016; Amazon, 2016; Estação Verde, 2016).

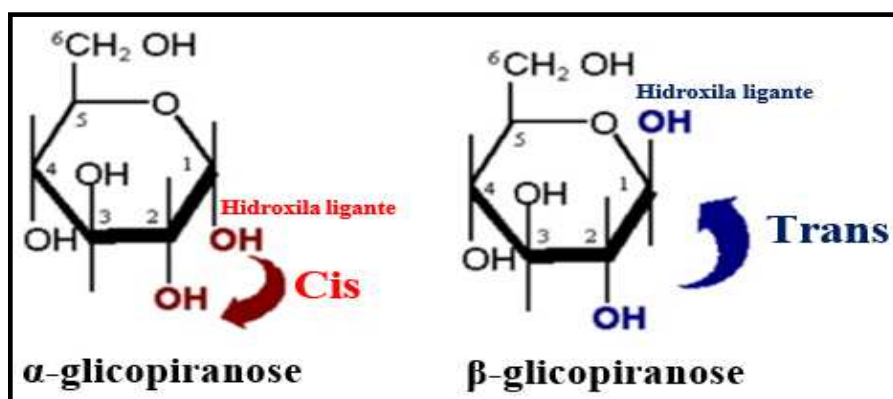
Portanto, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia acessível e de baixo custo que possibilite a utilização da Fração II (rejeito agroindustrial) para a extração e purificação de macromoléculas do tipo  $\beta$ -glucanas biologicamente ativas, uma vez que ainda não foi avaliada a detecção desta neste rejeito.



## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 GLUCANAS

As glucanas são os polissacarídeos mais difundidos na natureza e são formados por subunidades de D-glicose (monossacarídeos) unidas por ligações glicosídicas (Silva, 2006; Hertzog, 2013; Pizarro, 2014). Em relação à estrutura, as glucanas possuem características distintas. Se o monossacarídeo for composto por um anel de seis membros é chamado de anel piranosídico, mas se houver cinco membros é chamado de anel furanosídico (Gallo e Basso, 2012; Gallo, 2016). Na forma cíclica da molécula de glicose, o carbono no qual ocorre a formação da ligação hemiacetal é denominado "carbono anomérico" e sua hidroxila ligante pode assumir as formas  $\alpha$  (alfa) ou  $\beta$  (beta) (Gallo, 2016). Quando a hidroxila ligante ao carbono anomérico está no mesmo lado da hidroxila seguinte no plano do anel (conformação cíclica da molécula de carboidrato), a molécula é denominada  $\alpha$  (conformação Cis = alfa-glicopirranose) e, quando a hidroxila ligante ao carbono anomérico está em lado oposto da próxima hidroxila, no plano do anel a molécula é denominada  $\beta$  (conformação Trans = beta-glicopirranose) (**Figura 1**) (Gallo, 2016).

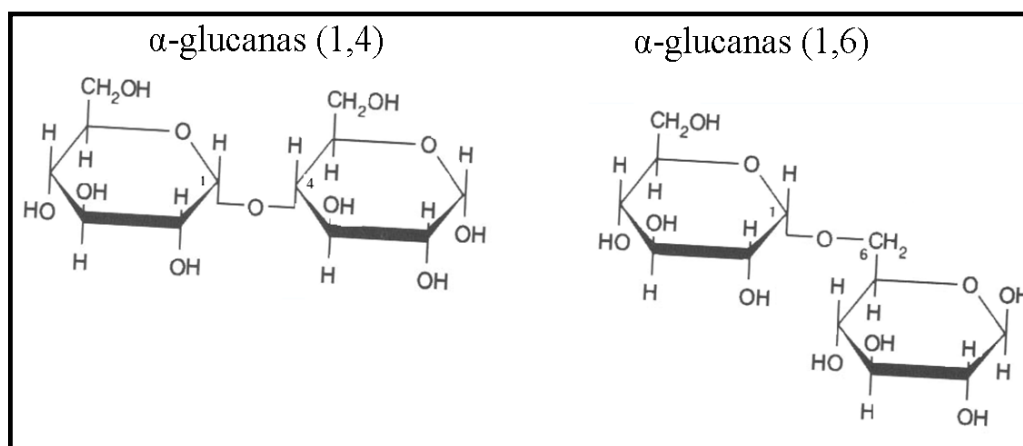


**Figura 1:** Diferenças entre a conformação de moléculas cíclicas de carboidratos na forma  $\alpha$  (Cis) e  $\beta$  (Trans) (Gallo e Basso, 2012; Gallo, 2016). Adaptado.

## 2.2 ALFA-GLUCANAS

As  $\alpha$ -glucanas estão presentes em vegetais, animais (glicogênio) e na parede celular de alguns microrganismos (Synytsya & Novak, 2014), podendo ser encontradas como uma amilose (com cadeia linear do tipo (1,4) ou amilopectina (com ramificações do tipo (1,6). Além disso, são constituídas de homopolissacarídeos (moléculas constituídas por um só tipo de monômero de glicose, exemplo: amido) ou heteropolissacarídeos (moléculas constituídas por mais de um tipo de unidade monomérica, exemplos: peptideoglicano e proteoglicanos), com uma estrutura molecular linear predominante (Synytsya & Novak, 2014).

Dentre os registros encontrados na literatura sobre a extração e purificação de  $\alpha$ -glucanas, destacam-se as metodologias que utilizam a batata *Solanum tuberosum* como fonte, uma vez que apresenta em sua composição glucanas do tipo  $\alpha$ -(1,4) e  $\alpha$ -(1,6) (**Figura 2**) (Garcia, 2013). Outras fontes de obtenção de  $\alpha$ -glucanas são *Tremella mesentérica* e *Aureobasidium pulluans* (espécies de fungo) (Silva, 2006). Esta última é utilizada na conservação dos alimentos, mantendo o sabor e prolongando o período para o consumo, uma vez que possui a capacidade de formar filmes solúveis em água, ser inodora, insípida e com baixa permeabilidade de oxigênio (Sutherland, 1998; Barbosa, 2004).

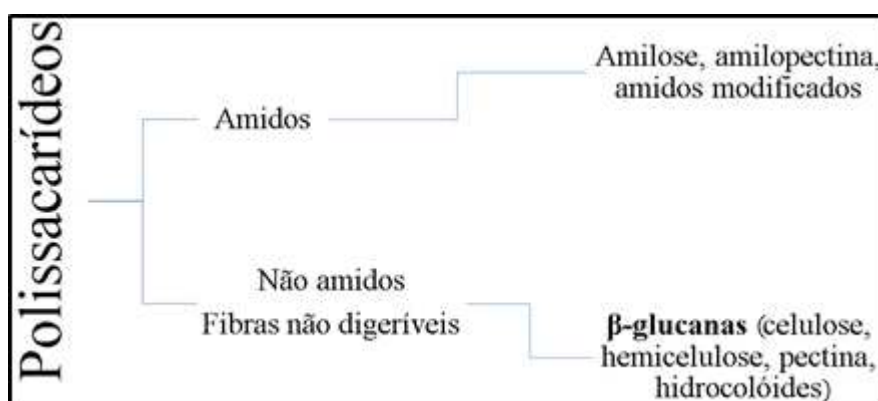


**Figura 2:** Estrutura das moléculas do tipo  $\alpha$ -glucanas (1,4) e (1,6) (Gallo & Basso, 2012; Gallo, 2016). Adaptado.

## 2.3 BETA-GLUCANAS

### 2.3.1 Definição

As  $\beta$ -glucanas são macromoléculas “não amidos” formadas por monômeros de glicose unidos por ligações  $\beta$ -glicosídicas, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose (anéis tipo  $\beta$ -D-glicopirranose) da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (**Figura 3**) (F.A.O, 1998; Magnani, 2008; Manson., 2011).


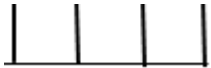




**Figura 3:** Divisão dos polissacarídeos como amidos e não amidos e classificação das  $\beta$ -glucanas (F.A.O, 1998; Magnani, 2008; Manson., 2011). Adaptado

As fibras dietéticas são porções de plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção do intestino delgado humano (FAO, 1998; A.A.C.C., 2001; Magnani, 2008). O termo fibra dietética inclui polissacarídeos como celulose, hemicelulose, pectina, hidrocolóide, inulina, oligofrutana,  $\beta$ -glucanas, dentre outras (F.A.O, 1998; A.A.C.C., 2001; Magnani, 2008; Manson, 2011), podendo ser classificadas como solúveis ou insolúveis e sua classificação dependerá diretamente das ligações e ramificações  $\beta$ -glicosídicas (A.A.C.C., 2001; Magnani, 2008; Pizarro, 2014).

As fibras do tipo  $\beta$ -glucanas, com ramificações tipo  $\beta$ -(1,3)-(1,6), são comumente encontradas em fungos e bactérias (**Tabela 1**) e podem ser classificadas como insolúveis ou solúveis (Pizarro, 2014). Entretanto, as fibras com ramificações do tipo  $\beta$ -(1,3)-(1,4) são normalmente encontradas em cereais como aveia, cevada, centeio, sorgo e são classificadas como fibras solúveis (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Origem, estruturas, tipo de ligações  $\beta$ -glicosídicas e tipo de fibra dietética.

Origem das $\beta$ -glucanas	Estruturas	Tipo de ligações	Tipo de fibra dietética
Bactérias		$\beta$ -glucanas linear (1,3)	Solúveis e insolúveis
Fungos		$\beta$ -glucanas (1,3)-(1,6) com ramificadas curtas	Solúveis e insolúveis
Leveduras		$\beta$ -glucanas (1,3)-(1,6) com ramificadas longas	Solúveis e insolúveis
Cereais		$\beta$ -glucanas linear (1,3)-(1,4)	Solúveis

**Fonte:** (Vaclav & Miroslav, 2013; Pizarro, 2014). Adaptado.

Conforme foi verificado (**Tabela 1**) as  $\beta$ -glucanas podem, dependendo da fonte, serem fibras dietéticas solúveis ou insolúveis e sua estrutura vai variar entre a cadeia linear ou ramificada (Vaclav & Miroslav, 2013; Pizarro, 2014).

### 2.3.2 Estrutura molecular

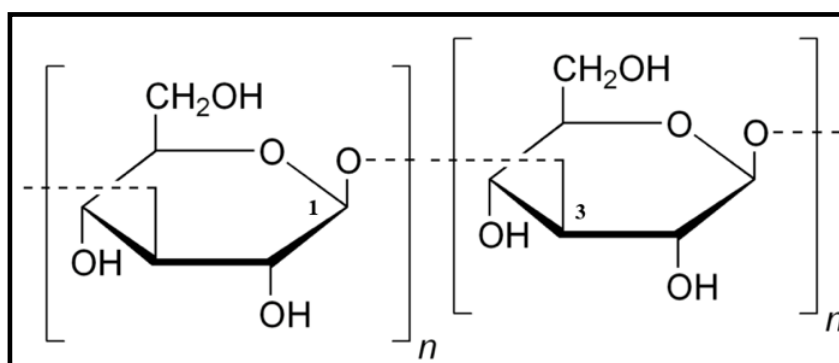
Avaliando cada tipo de  $\beta$ -glucana, observam-se características específicas tais como esqueleto molecular distinto, nível de ramificação (tipo de ligação glicosídica) e um peso molecular que afeta a sua solubilidade e ação fisiológica (Vaclav & Miroslav, 2013; Pizarro, 2014). Assim, conclui-se que todas as macromoléculas extraídas de produtos naturais são uma variação de diferentes polímeros de glucanas com comprimento, massa molecular, ramificações de cadeia lateral e conformação diferentes (Vaclav, 2009; Vaclav & Miroslav, 2013; Pizarro, 2014), conforme demonstrado anteriormente (**Tabela 1**) e a seguir (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Estimativa de massa molecular (atômica) de algumas  $\beta$ -glucanas.

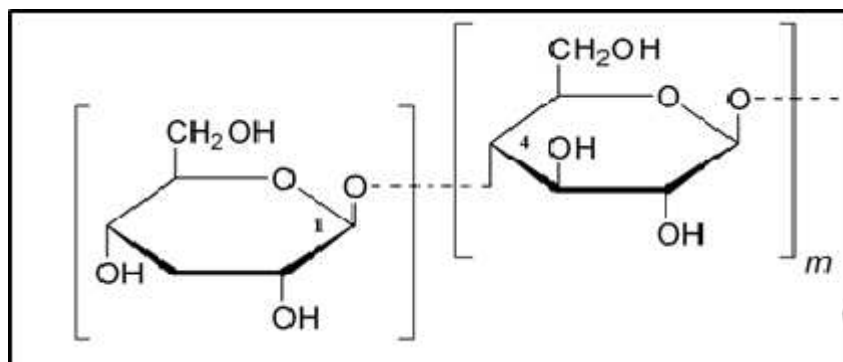
Fonte	Tipo de ligação glicosídica	Massa atômica
<i>Euglenóides</i> (algas)	$\beta$ -(1,3)	200-500 kDa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura)	$\beta$ -(1,3) e $\beta$ -(1,3)-(1,6)	200 kDa
<i>Alcaligenes faecalis</i> (Bactérias Gram-negativa)	$\beta$ -(1,3)	50-200 kDa
<i>Fucus vesiculosus</i> e <i>Laminaria digitata</i> (algas marrons)	$\beta$ -(1,3) e $\beta$ -(1,3)-(1,6)	7,7 kDa
<i>Avena sativa</i> (aveia)	$\beta$ -(1,3)-(1,4)	50-3000 kDa

**Fonte:** (Vaclav & Miroslav, 2013). Adaptado.

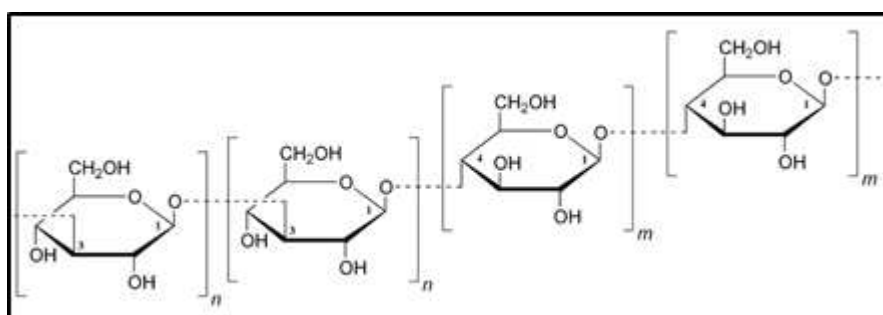
A estrutura molecular e, especialmente, o tipo de ligação das cadeias principais e ramificadas vão depender da fonte das  $\beta$ -glucanas (Magnani, 2008). A estrutura de fontes, como aveia e cevada, podem ser compostas por cadeias não ramificadas com ligações  $\beta$ -(1,3) e  $\beta$ -(1,4) (**Figuras 4 e 5**) ou por cadeias ramificadas do tipo  $\beta$ -(1,3)-(1,4) (**Figura 6**), enquanto que as oriundas de fungos constituídas por cadeias do tipo  $\beta$ -(1,3), podendo ter ramificações  $\beta$ -(1,6) (**Figura 7**) (Bathy, 1995; Dongowski, 2005; Magnani, 2008 e Pizarro, 2014).



**Figura 4:** Estrutura de  $\beta$ -glucana com ligações glicosídicas do tipo (1,3) (Bathy, 1995; Dongowski, 2005; Pizarro, 2014). Adaptado.

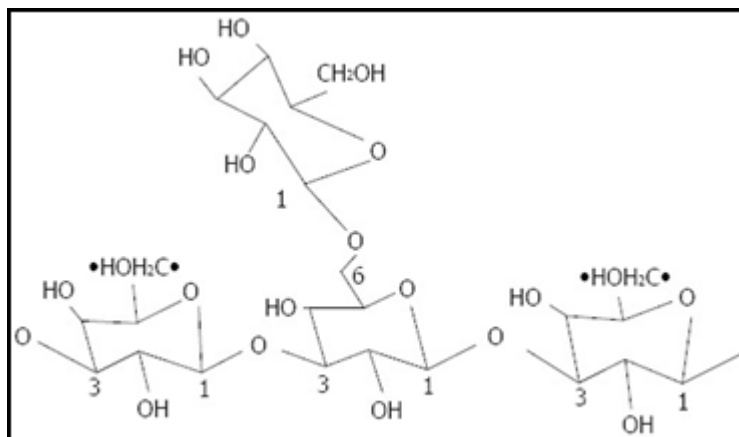


**Figura 5.** Estrutura de  $\beta$ -glucana com ligações glicosídicas do tipo (1,4) (Bathy, 1995; Dongowski, 2005; Pizarro 2014). Adaptado.



**Figura 6.** Estrutura de  $\beta$ -glucana com ligações glicosídicas do tipo (1,3)- (1,4). (Bathy, 1995; Dongowski, 2005; Pizarro 2014). Adaptado.

As moléculas com ligações do tipo  $\beta$ -(1,3) e  $\beta$ -(1,6) (**Figura 7**) são constituídas por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição  $\beta$ -(1,3), com cadeias laterais unidas em  $\beta$ -(1,6), que ocorrem em diferentes intervalos e têm tamanhos variados ao longo do centro da cadeia linear. As  $\beta$ -(1,3) têm tamanho estimado de 1500 resíduos de glicose. Por outro lado, a  $\beta$ -(1-6) apresentam entre 150 a 200 resíduos de glicose (Magnani, 2008; Manson, 2011; Hertzog, 2013).



**Figura 7.** Estrutura de  $\beta$ -glucana com cadeias ramificadas do tipo (1,3)-(1,6) (Bathy, 1995; Dongowski, 2005; Pizarro 2014). Adaptado.

Nos cereais, as  $\beta$ -glucanas estão presentes nas paredes dos grãos e sementes, apresentando ligações do tipo  $\beta$ -(1,3)-(1,4) (**Figura 6**) e formando polímeros complexos de polissacarídeos não amidos (Bhatty, 1993; Pizarro, 2014). As moléculas unidas por ligações do tipo  $\beta$ -(1,4) correspondem a cerca de 70% das ligações glicosídicas e são as mais encontradas em fontes *in natura*, como observado em cevada e aveia (Manson, 2011; Hertzog, 2013). Dentre todos os tipos de cereais, aqueles que apresentam o maior teor de  $\beta$ -glucanas são: cevada (2~12g/100g), aveia (3~8g/100g de produtos *in natura*), sorgo (1~6g/100g de produto *in natura*), dentre outros demonstrados na **Tabela 3** (Akramienė et al., 2007; Pizarro, 2014).

**Tabela 3:** Rendimento das  $\beta$ -glucanas em 100g de produto *in natura*.

<b>Produto <i>in natura</i></b>	<b>Rendimento (g)</b>
Cevada	2~12
Aveia	3~8
Sorgo	1~6
Centeio	1~2
Cogumelos	10~50

Levedura

20~35

**Fonte:** (Akramiené et al., 2007; Pizarro, 2014). Adaptado.

A quantidade de  $\beta$ -glucanas, conforme visto na **Tabela 3**, pode variar muito dependendo da fonte da extração e das condições climáticas em que foi obtida a matéria prima para a extração, por exemplo, nos cereais o tipo de solo e o clima são fatores que interferem diretamente no rendimento (Pizarro, 2014).

### 2.3.3 Principais aplicações das $\beta$ -glucanas

As moléculas do tipo  $\beta$ -glucanas possuem a capacidade de agregar diversas propriedades físicas, tais como: espessamento, estabilização, emulsificação e geleificação. Devido ao seu potencial, elas são aplicadas nas áreas da medicina, nutrição, farmácia, indústrias alimentícias, cosmética e química (Fengmei et al., 2016, Zhu et al., 2016). Na **Tabela 4** demonstram-se algumas aplicações e funcionalidades das  $\beta$ -glucanas.

**Tabela 4.** Principais utilidades das  $\beta$ -glucanas nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

$\beta$ -glucanas	Produto	Funcionalidade
	Salsicha e hambúrguer	Modifica as características físicas e sensoriais dos produtos quando comparados aos tradicionais: maior quantidade de fibras; menor quantidade de gorduras; melhor sabor e textura
Alimentos	Pão/bolos sem glúten	Modifica as características sensoriais dos produtos, melhorando a textura e o sabor. Aumenta a quantidade de fibras e reduz as calorias.
	Alimentos modificados para dietas especiais, exemplo, biscoitos e barra de cereais	Diminui a resposta glicêmica e a absorção de gorduras



	Bebidas	Aumenta a saciedade e diminui a ingestão de calorias
Cosméticos	Hidratantes, cremes, loções	Reduz as rugas e linhas de expressão, mantém a hidratação da pele, atua como rejuvenescedor, previne perda de colágeno, e auxilia no branqueamento de manchas escuras
	Pomada/loção	Melhora a cicatrização
Medicina	Colírio	Melhora a hidratação ocular
	Curativo	Melhora a resposta terapêutica e o processo de cicatrização em feridas em geral e em queimaduras
	Suplemento alimentar	Melhora os níveis glicêmicos pós-prandiais, diminui os níveis de colesterol total e LDL, melhora a resposta imunológica e auxilia no tratamento das DCNTs e das infecções fúngicas, parasitárias e bacterianas

**Fonte:** (Fengmei et al., 2016, Zhu et al., 2016). Adaptado.

Assim pode-se inferir que polissacarídeos como as  $\beta$ -glucanas tem um grande potencial biotecnológico na indústria mundial (Fengmei et al., 2016; Zhu et al., 2016).

### 2.3.4 Atividade biológica das $\beta$ -glucanas e os benefícios à saúde

Algumas pesquisas demonstraram a necessidade de melhorar a qualidade dos alimentos que fazem parte da dieta da população mundial (Costa, 2004; WHO, 2016 e 2017). Notavelmente, o consumo excessivo de carboidratos simples como os açúcares, massas, *fast food*, biscoitos, sorvetes, dentre outros, estão ligados a um maior risco de desenvolvimento de doenças como as dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes, cânceres, infecções fúngicas, bacterianas, dentre outras enfermidades (Barreto et al., 2005; Sartorelli & Cardoso, 2006; WHO, 2016 e 2017).

A principal orientação nutricional da Organização Mundial da Saúde é que a população humana reduza a ingestão de açúcares e gorduras e aumente a ingestão de alimentos mais saudáveis (WHO, 2017). As frutas e as verduras, devido a compostos bioativos e fibras, se destacam por otimizar a melhoria da qualidade de vida dos

indivíduos, bem como na prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (WHO, 2017). Outra fonte saudável de alimentação são os cereais, como aveia, centeio, cevada e sorgo, que evidenciaram uma boa fonte de fibras solúveis e insolúveis como as  $\beta$ -glucanas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Fibras solúveis e insolúveis, principais fontes, tipos e benefícios

Classificação	Fonte	Tipo de fibra	Ação no organismo humano
Fibras Solúveis	Frutas, verduras, aveia, cevada, centeio, leguminosas (feijão, lentilha, soja, grão de bico), cogumelos, dentre outros.	<b><math>\beta</math>-glucanas,</b> (pectina, gomas, mucilagem, hemiceluloses)	Retardo na absorção de glicose; Redução no esvaziamento gástrico (maior saciedade); Diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo; Anticancerígena
	Verduras, farelo de trigo, alimentos fontes de cereais integrais (massas, pães, biscoitos) leveduras.	<b><math>\beta</math>-glucanas,</b> (lignina, celulose, hemiceluloses)	Aumento do bolo fecal; Estímulo ao bom funcionamento intestinal (aceleração do trânsito); Prevenção de constipação intestinal.

**Fonte:** (FAO, 1998; Magnani, 2008; WHO, 2017). Adaptado.

Após administração oral, as  $\beta$ -glucanas são absorvidas pelo intestino delgado proximal (duodeno) e internalizadas pelos macrófagos residentes (Aleem, 2013). A cadeia  $\beta$ -glicosídica é internalizada e fragmentada em frações menores e, então, carregada para a medula óssea e para o sistema reticular endotelial (sistema orgânico constituído por células que têm características reticulares e endoteliais e são dotadas de capacidade fagocitária) e linfonodos e, conseqüentemente, granulócitos circulantes, monócitos e células dendríticas (Aleem, 2013; Vaclav & Miroslav, 2013).

Contudo, a atividade biológica das  $\beta$ -glucanas está diretamente relacionada com a estrutura, propriedades físico-químicas e características reológicas (fluxo da deformação dos materiais sob aplicação de forças que são valiosas para seu emprego industrial como a

viscosidade, por exemplo). A ativação do sistema imunológico é dependente dessas características, cujo mecanismo ocorre pelo reconhecimento de vários receptores presentes na superfície de células imunológicas, como células dendríticas e macrófagos (Vaclav, 2009; Novak, 2009; Novak et al., 2012.; Pizarro, 2014). As  $\beta$ -glucanas podem ativar as respostas no sistema imunológico inato quando se ligam aos sítios de ligação dos receptores de fagócitos chamados de Dectina-1, cuja interação estimula a secreção de proteínas pró inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1) auxiliando no combate a patógenos como bactérias e fungos (Novak, 2009; Hertzog, 2013). Além disso, por meio da ativação do receptor Dectina-1 e em colaboração com os receptores TLR-2 e 6 (TLR2/6), ocorre a potencialização da secreção de várias citocinas como IL-12, IL-6, IL-10 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Estes por sua vez, desencadeiam a apoptose celular, uma importante reação do sistema imune na terapia contra alguns tipos de câncer como o de cancro, por exemplo (Aleem, 2013; Vaclav & Miroslav, 2013). Ademais,  $\beta$ -glucanas atuam tanto na imunidade inata quanto adaptativa e, conseqüentemente, podem ativar diretamente os leucócitos auxiliando no combate a alguns patógenos como os *Streptococcus suis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus sp.*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei*, *Mesocestoides corti*, *Trypanosoma cruzi* e *Eimeria vermiformise* (Akramienè, 2007; Novak, 2009; Vaclav, 2011).

Um estudo de meta-análise realizado em 2014 demonstrou que o consumo de aveia ou de derivados em uma concentração de  $\beta$ -glucana  $\geq 3\text{g/dia}$ , reduziu o colesterol sérico após duas semanas em indivíduos adultos, com ou sem Diabetes do tipo II (Whitehead, 2014). No Japão, um estudo semelhante utilizando métodos observacionais de coorte (o termo coorte é utilizado para investigar um grupo de indivíduos que têm em comum um conjunto de características e que são observados durante um período de tempo com o intuito de analisar a relação existente entre a presença de fatores de riscos/características e o desenvolvimento de enfermidades) e de caso-controle (estudos epidemiológicos observacionais, longitudinais, retrospectivos, analíticos e desenhados para permitir determinar se uma exposição está associada com um desfecho) demonstrou que, mulheres em idade pré e pós-menopausa e que adicionavam cogumelos à sua alimentação diária demonstraram menos chance de desenvolver câncer de mama quando comparado com mulheres que não tinham o hábito de consumir cogumelos em suas refeições diárias (**Tabela 6**) (Zhang et al., 2009; Li, 2014).

Um tratamento preventivo contra infecções bacterianas é a antibioticoterapia que, devido ao uso de forma indiscriminada pela população humana, influenciou no aumento de microrganismos resistentes a antibióticos (Onderdonk et al. 1992; Wannmacher, 2004; Zimerman, 2010). Diante desta nova realidade, estratégias alternativas têm sido estudadas para o controle de cepas resistentes (Hertzog, 2013). Compostos bioativos presentes nos alimentos, como as  $\beta$ -glucanas, têm mostrado resultados promissores e auxiliado no combate a infecções oportunistas (Aleem, 2013; Beta Glucan Org, 2016). Estas moléculas, por suas propriedades, também atuam fortalecendo o sistema imune do hospedeiro e, assim, contribuem no combate a agentes patológicos, tais como as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Kernodle et al, 1998; Akramiené, 2007). Em um estudo *in vivo* onde 2,5% dos alimentos oferecidos aos camundongos eram  $\beta$ -glucanas, verificou-se uma diminuição do risco de infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e por *Candida albicans* (Tanioka et al., 2012). Em ensaios realizados por Liang et al. (1998) foi verificado que a administração de  $\beta$ -glucana (1,3) purificada, via intramuscular, em ratos, na dosagem de 0,5-4,0 mg/kg reduziu significativamente as unidades formadoras de colônias de *S. aureus*, no sangue das cobaias. Esta diminuição permaneceu por 48 horas após a administração, quando comparados aos grupos de controle. Neste mesmo estudo também se verificou que as  $\beta$ -glucanas, quando administradas juntamente com o antibiótico (ampicilina), melhorou a eficácia no tratamento da infecção induzida por *S. aureus* (**Tabela 6**) (Liang et al., 1998).

Ensaio feito por Willians et al. (1998), usando ratos como cobaia, mostrou que a administração intraperitoneal de  $\beta$ -glucana (150mg/kg) teve efeito benéfico no tratamento contra peritonite causada pela bactéria *E. coli*. Eles concluíram que a  $\beta$ -glucana aumentou os níveis de neutrófilos peritoneal e no sangue periférico e, *in vitro*, os neutrófilos dos ratos que receberam a  $\beta$ -glucana, mostraram fagocitose aumentada da bactéria *E. coli* (Williams et al., 1998). Min et al. (2005) verificou em seu estudo *in vitro* que as  $\beta$ -glucanas na concentração de 1.29mg/mL obtiveram uma inibição de crescimento da bactéria *E. coli* em 50% quando aumentou a concentração para 2mg/mL a inibição foi de 80%.

**Tabela 6.** Alguns estudos com  $\beta$ -glucanas *in vivo* e *in vitro*: dosagens e efeitos

<b>Tipo de estudo</b>	<b>Dosagens</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
Meta-análise em estudos feitos com humanos adultos com dislipidemia	3g/dia, duas semanas, via oral	Redução do colesterol total e do colesterol LDL	Whitehead, 2014
Estudos de coorte e caso-controle em mulheres pré e pós-menopausa	Consumo habitual de cogumelos	Diminuição de casos de câncer de mama nas mulheres que tinham por hábito a ingestão dos cogumelos nas refeições diárias	Zhang et al., 2009; Li, 2014;
Indivíduos adultos	4,0g-8g/ no desjejum, via oral	Diminuição em 50% no pico de glicose plasmática	Mira et al., 2009
Estudo randomizado, controlado com indivíduos com diabetes tipo II	Bebida com 5g, via oral	Diminuição na média dos níveis de glicemia pós-prandial, colesterol total,	Mira et al., 2009
Estudo clínico randomizado, 50 pacientes com câncer de esôfago	Medicamento Tegafur + 1g de $\beta$ -glucanas /dia por cinco dias	Os níveis séricos de IL-2, IL-6 e IL-12 aumentaram enquanto que os níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 diminuíram. Houve uma melhora da condição geral e na qualidade de vida dos pacientes	Wang et al., 2012
Estudo clínico randomizado: homens com níveis de PSA total e Livre alterados	200mg/dia, dois meses, via oral	Diminuição dos níveis do PSA livre e total	Vaclav, 2014
Camundongos	50mg/dia, via oral	Inibiram o crescimento das células cancerígenas e induziram a apoptose.	Kabasakal, 2011
Camundongos	2,5% da alimentação oferecida	Reduziu o risco de infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina e <i>Candida albicans</i>	Tanioka et al., 2012
Ratos	0,2mg-20mg/kg,	Inibição da toxina Letal do	Vaclav, et al., 2002

	via oral, sete dias antes da infecção por <i>Antrax</i>	bacilo <i>Antrax</i>	
<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	1,29mg/mL	Inibição de crescimento da bactéria <i>E. coli</i> em 50%	Min et al., 2005
<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	2mg/mL	Inibição de crescimento da bactéria <i>E. coli</i> em 80%	Min et al., 2005

**Fonte:** (Sales, NMR., 2017).

Conforme exposto na **Tabela 6**, as  $\beta$ -glucanas apresentam efeitos notáveis no combate a várias DCNTs e a infecções oportunistas como as causadas por microrganismos, por exemplo (Zhang et al., 2009; Václav, 2009; Vaclav & Miroslav, 2013; Whitehead, 2014; Li, 2014). As  $\alpha$ -Glucanas também têm demonstrado alguns efeitos benéficos à saúde, conforme veremos a seguir.

### 2.3.5 Atividade biológica das $\alpha$ -glucanas e benefícios à saúde

Os resíduos glicosídicos com ligações  $\alpha$ -(1,3) extraídos do cogumelo *Ganoderma lucidum* foram avaliados em um estudo, demonstrando que a molécula sulfatada apresentou atividade antitumoral contra o carcinoma de *Ehrlich* (Silva, 2006). Ademais, ensaios *in vivo* realizados com  $\alpha$ -D-glucanas (1,6), extraídas da *Ipomoea batatas* (batata doce) sugeriram que a molécula poderia melhorar o sistema imune, bem como poderia ser considerada como um modificador de resposta biológica (Zhaoa, 2005). Outro trabalho utilizando  $\alpha$ -glucanas extraída do líquen do fungo *Ramalina celastrini*, indicou que os animais que receberam 200mg/kg/dia da glucana via intraperitoneal, apresentaram uma diminuição de aproximadamente 80% no desenvolvimento de tumores cancerígenos do tipo sarcoma 180, quando comparados com o grupo controle (Stuelp-Campelo, 2002).

### 2.3.6 Protocolos de extração e purificação e patentes das $\beta$ -glucanas

Existem vários procedimentos de extração e isolamento das moléculas de  $\beta$ -glucanas descritos na literatura (Many e Vizhi, 2014; Zhu et al., 2016) e, dependendo da fonte e da metodologia utilizada, ocorre uma grande variedade de moléculas distintas quando comparada a massa molecular e tipos de ramificações (Synytsya & Novak, 2014; Zhu et al., 2016). Este nível de complexidade estrutural e variabilidade apresenta um grande desafio para os pesquisadores no intuito de compreender a química e a atividade biológica das glucanas (Vaclav & Miroslav, 2013).

Diversos protocolos de extração e purificação já foram desenvolvidos e os que demonstraram um maior rendimento de  $\beta$ -glucanas foram patenteados, principalmente devido às propriedades bioativas da molécula (**tabela 7**) (Many e Vizhi, 2014; Zhu et al., 2016). Os métodos podem ser classificados em químicos, físicos ou enzimáticos, podendo ser utilizados para um tipo específico de produto *in natura* ou para extrair e purificar moléculas de diferentes fontes, como aveia, cevada, milho e cogumelos (Vaclav & Miroslav, 2013; Many e Vizhi, 2014; Zhu et al., 2016). Dentre estas metodologias de extração e purificação de  $\beta$ -glucanas podemos citar como exemplos a de Georing e Eslick (1988), uma das primeiras a ser patenteada e a de Chen (2014) patenteada há três anos. O método proposto por McCleary et al., (2010) consiste em um método enzimático, físico e de hidrólise. Este método foi aprovado pela *Association of Official Analytical Chemists* (A.O.A.C) e pela *American Association for Clinical Chemistry* (A.A.C.C.). Lee, 1992). Bhatti (1995). Temelli (1997), Dongowski et al., (2005) e Redmond & Fielder (2006) desenvolveram métodos que, embora diferentes entre si, utilizavam meios químicos e físicos para a extração das moléculas do tipo  $\beta$ -glucanas (Many e Vizhi, 2014; Zhu et al., 2016). Ahmad et al., (2010) desenvolveu uma metodologia enzimática para a extração de  $\beta$ -glucanas de aveia. Todavia, Tian et al., (2012) desenvolveram uma metodologia utilizando ultrassom, precipitação com etanol e centrifugação para o isolamento de  $\beta$ -glucanas do fungo *Agaricus bisporus*. Du et al., (2014) desenvolveram um protocolo que utilizam uma extração otimizada baseada em solvente para a extração destes polissacarídeos da *Hordeum vulgare* (cevada sem casca). Abaixo, **Tabela 7**, veremos algumas patentes concedidas pela *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), quanto à extração e utilização de  $\beta$ -glucanas.

**Tabela 7.** Algumas patentes provenientes da extração e utilização de  $\beta$ -glucanas.

<b>Campo da patente</b>	<b>Fonte</b>	<b>Patente</b>	<b>Referencia</b>
Tecnologia de produção	Cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	US 4804545	Georing e Eslick (1988)
Tecnologia de produção	Cereais em geral (aveia, cevada, centeio)	US 5518710	Bathy (1996)
Tecnologia de produção	Cereais em geral (aveia, cevada, centeio)	US 0192770	Morgan (2002)
Aplicação na medicina	Fungos em geral (leveduras e cogumelos)	US20060293278 A1	Kelly (2006)
Tecnologia de produção	Fungos ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	US7550584 B2	Bahl et al. (2009)
Tecnologia de produção	Fungo ( <i>Schizophyllum commune</i> )	US20080160043 A1	Kim et al. (2008)
Aplicação na medicina	Alga ( <i>Laminaria digitata</i> ), fungos ( <i>Lentinula edodes</i> , <i>Grifola frondosa</i> ) e cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	US20130230535 A1	Cheung (2013)
Aplicação em cosméticos	Fungo ( <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Antrodia comphorata</i> , <i>Agaricus brazil</i> , <i>Coriolus</i> <i>versicolor</i> and <i>Schizophyllum commune</i> )	US20140031542 A1	Chen (2014)

**Fonte:** (Sales, NMR, 2017)

Conforme verificado, existem muitas metodologias relatadas na literatura para extração e purificação destas macromoléculas. Há, também, muitas patentes provenientes da extração e utilização das  $\beta$ -glucanas de cereais e microrganismos (**Tabela 7**), porém, o isolamento destes polissacarídeos em resíduo agroindustrial descrito neste trabalho é um dos primeiros estudos da área.

Os dois métodos mais utilizados para a quantificação e caracterização de moléculas do tipo  $\beta$  e  $\alpha$ -glucanas são o método enzimático e a Ressonância Magnética Nuclear



(Synytsya & Novak, 2014). O método enzimático é um método simples e quantitativo para a determinação de moléculas do tipo  $\beta$ -glucanas (McCleary & Glennie-Holmes, 1985; McCleary & Nurthen, 1986; McCleary & Codd, 1991; McCleary, 2010), cuja validação e aprovação da técnica foi emitida pela A.O.A.C. (Método 995.16), A.A.C.C., (Método número 32-23.01), e pela *International Association for Cereal Science and Technology* (I.C.C.), Método Número 166 (Megazyme, 2015). O método também foi avaliado com êxito pelos Comitês Analíticos do *Royal Australian Chemical Institute* e a pela Convenção Europeia sobre a Indústria da Especificidade.

Dentre os vários métodos existentes, para as análises estruturais mais rigorosas dos polissacarídeos do tipo  $\alpha$  ou  $\beta$ -glucanas, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear com marcação do  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$  RMN) e a ressonância magnética nuclear do hidrogênio em água deuterada ( $^1\text{H}$  RMN  $\text{D}_2\text{O}$ ) são os métodos mais utilizados pois permitem a inferência do grau de pureza, da estrutura dos polissacáridos testados, do tipo de ligação entre os monossacarídeos, da configuração ( $\alpha$  ou  $\beta$  anomérica) e da cadeia lateral do polímero (Solomons e Fryhle, 2006; Synytsya & Novak, 2014; Hornak, 2016).

### 2.3.7 Valor comercial das $\beta$ -glucanas

Para avaliar o preço de venda ao consumidor de produtos ricos ou purificados de  $\beta$ -glucanas, uma pesquisa de preço foi feita (online e *in loco*). Após a coleta dos dados, foram calculadas as médias simples dos preços obtidos, que estão apresentadas na **Tabela 8**, abaixo.

**Tabela 8.** Média de preços de produtos ricos em  $\beta$ -glucanas ou de  $\beta$ -glucanas purificadas disponíveis no mercado.

Produto	Média de preço (em reais)	Referência do preço final de venda
Cogumelo <i>Agaricus blazei</i>	45,00 (frasco, 120 cápsulas de 300 mg de cogumelo cada)	Estação verde, 2016; Wal-Mart, 2016
Aveia	5,00 (pacote com 200 g de aveia em flocos)	Estação verde, 2016; Pão de Açúcar, 2016

	466,00	
	(frasco, 60 cápsulas com 500 mg de $\beta$ -glucana	Amazon, 2016
$\beta$ -(1,3)-(1,6) purificada	cada).	
	120,00	
	(frasco, 60 cápsulas com 100 mg de $\beta$ -glucana	BIOVEA, 2016
	cada).	
	397,00	
Zymozan,	(envelope, 340 mg de $\beta$ -glucana purificada a	Sigma Aldrich, 2016
$\beta$ -(1,3)	99%)	
	* <b>65,00</b>	
<b><math>\beta</math>-glucanas obtida no</b>	<b>(6,9 g de <math>\beta</math>-glucanas purificadas a 94,5,</b>	
<b>trabalho</b>	<b>concentrado em pó)</b>	

**Fonte:** (Sales, N.M.R., 2017). \*(preço de custo final das  $\beta$ -glucanas purificadas utilizando a metodologia desenvolvida, neste projeto, para o aproveitamento da Fração II)

Conforme visto na **Tabela 8**, o preço de venda de moléculas do tipo  $\beta$ -glucana vai depender diretamente da sua origem, estrutura e grau de pureza. Por exemplo, a aveia (100g) possui em sua composição uma média de 2-8 g de moléculas do tipo  $\beta$ -glucanas (1,3)-(1,4) (Zhu, 2016). Nos supermercados ou lojas de produtos naturais um pacote de 200g de aveia em flocos custa, em média, R\$ 5,00 (cinco reais) (Estação Verde, 2016; Pão de Açúcar, 2016). Por serem ricos em macromoléculas do tipo  $\beta$ -glucanas, os cogumelos possuem um preço de venda mais elevado. O cogumelo da espécie *Agaricus blazei* é um dos que possui grande quantidade de  $\beta$ -glucanas, cuja obtenção é de aproximadamente 30g de macromoléculas  $\beta$ -(1,3)-(1,6) a cada 100g do macrofungo *in natura*. Na pesquisa de preços, foi verificado que o frasco unitário contendo 120 cápsulas de 300mg de cogumelo custa, em média, R\$ 45,00 (quarenta e cinco reais) (Colauto et al., 2011; Wal-Mart, 2016; Mundo Verde, 2016). Quando se trata da  $\beta$ -(1,3)-(1,6) purificada em aproximadamente 95% (noventa e cinco por cento) o preço de venda ao consumidor pode variar, citamos aqui dois exemplos: I) frasco com 60 cápsulas contendo 500mg de  $\beta$ -glucana custa R\$ 466,00 (quatrocentos e sessenta e seis reais); II) frasco com 60 cápsulas de 100mg de  $\beta$ -glucana cada custa R\$ 120,00 (cento e vinte reais). Se usarmos 10g de  $\beta$ -(1,3)-(1,6) purificada como valor de referência, no primeiro fornecedor, o valor de venda de 10g será de R\$ 155,00 (cento e cinquenta e cinco reais) e no segundo os mesmos 10g custam R\$ 200,00 (duzentos reais), ou seja, custam 22,5% a mais (Amazon, 2016; BIOVEA, 2016). Outra fonte de  $\beta$ -glucana (1,3) purificada é o reagente *Zymozan* (99,99% purificada) derivado da

levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este polissacárido, devido as suas propriedades bioativas, é muito utilizado em ensaios e experimentos científicos relacionados com o sistema imunológico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, logo seu preço de venda é alto com 340mg deste produto custando em torno de R\$ 397,00 (trezentos e noventa e sete reais) (Synytsya & Novak, 2014; Sigma, 2016).

O cálculo base dos custos de obtenção das  $\beta$ -glucanas, da Fração II, foram feitos baseados em Teixeira (2007) e Braga (2012), cuja avaliação considerou (1) a extração, (2) a purificação e (3) a metodologia desenvolvida neste projeto, analisando a utilização de matérias primas, reagentes, água, luz, dentre outros. Conforme podemos verificar (**Tabela 8**), foi possível extrair e purificar  $\beta$ -glucanas biologicamente ativas a um baixo custo, o que possibilita uma possível produção e custo final mais barato quando comparado a outros disponíveis no mercado, tornando-se assim um produto competitivo.

## 2.4 PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO II

### 2.4.1 Origem da batata

A batata *Solanum tuberosum* tem sua origem nos Andes Peruanos e Bolivianos, próximo ao Lago Titicaca onde é cultivada há mais de 7.000 anos. Em cada país recebe diferentes nomenclaturas; no Brasil é chamada de batata inglesa, no Chile de araucano ou *Poni*, na Colômbia de *Iomy*, na Espanha de *Papa*; na Itália de *Patata*, Na Irlanda de *Irish Potato* ou *White Potato* e assim por diante (A.B.B.A., 2016).

A batata foi introduzida na Europa por volta do ano de 1520 e foi responsável pela primeira Revolução Verde no velho continente. A difusão da batata pelo mundo ocorreu através da colonização realizada pelos países europeus. No Brasil foi introduzida por volta do ano de 1700 e os primeiros registros de estudos com as batatas datam de 1906 no Estado de São Paulo. Nos Estados Unidos, a batata começou a ter importância comercial apenas no fim da década de 1840 com a imigração Irlandesa. Inicialmente era uma cultura de subsistência, cultivada apenas em pequena escala em hortas familiares, sendo chamada de "batatinha". Apenas mais tarde, na construção das ferrovias no Brasil quando os engenheiros/técnicos ingleses exigiram a batata em suas refeições é que a espécie passou a

ser chamada de "batata inglesa" (A.B.B.A., 2016). Quanto à composição nutricional da batata, segundo estudos feitos pela OMS, em caso de emergência a batata e o leite seriam suficientes para suprir as necessidades nutricionais da população mundial (A.B.B.A., 2016). A batata inglesa é um alimento rico em carboidratos, minerais como potássio, magnésio, fósforo e cálcio (Philippi, 2002; UniCamp, 2006).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente, no Brasil, os compostos orgânicos representam em torno de 60% do total de resíduos gerados e a batata está entre eles pois as de pequeno porte, por não terem valor de comércio, são descartadas ainda no campo e as com pequenos defeitos são descartadas, mais tarde, nos centros de distribuição e/ou no comércio (Sabio et al., 2015).

O descarte de resíduo (proveniente da batata) no meio ambiente, pode trazer graves problemas de poluição. A irrigação de solos com a água residual da batata contamina a superfície, traz odores desagradáveis ao meio ambiente e leva nitrogênio e fósforo para a água do subsolo (Fernandes et al., 2008).

Porém, a grande maioria destas batatas, poderiam ser utilizadas para a fabricação de outros produtos tais como a fécula, flocos, farinhas, produtos extrusados, utilização para alimentação animal, produção de álcool e bioplásticos. O reaproveitamento das batatas, de pequeno porte e não comercializadas, para a produção de fertilizante e álcool e/ou outros produtos como citados anteriormente poderiam ajudar a amenizar estas perdas, no Brasil, de modo significativo e, ainda, seria um incentivo aos agricultores pois, estes, teriam uma renda extra da venda de um produto antes descartado na natureza (A.B.B.A., 2016).

#### **2.4.1 Reaproveitamento**

A preocupação com o meio ambiente se tornou um assunto de grande relevância e enorme repercussão (Sanseverino, 2000). A criação de programas que visam a redução e reutilização de resíduos quer sejam industriais, agroindustriais, eletrônicos ou outros se faz necessária (Gustavsson et al., 2011; Wadhwa et al., 2014) e uma das ideias difundidas é o emprego de biotecnologias economicamente viáveis para a utilização de resíduos (Sanseverino, 2000; Backes et al, 2007; Fernandes, et al., 2008; Aziabile et al., 2017). Neste contexto, Laufenberg et al. (2003), Rosa et al. (2011), Gudiña et al. (2016), Aziabile et al.,

(2017) relataram alguns exemplos de reaproveitamento de resíduos agroindustriais como matéria prima para a obtenção de novos produtos com valor comercial agregado.

Seguindo este raciocínio de reaproveitamento de resíduos orgânicos, uma agroindústria brasileira utiliza as batatas de pequeno porte e com pequenos defeitos (que seriam descartadas na natureza) para a produção de um adubo foliar.

#### 2.4.2 Origem da Fração II

Durante o processo de produção deste fertilizante, cuja patente está em andamento, ocorre a produção de um rejeito agroindustrial denominado Fração II (**Figura 8**), que foi cedida gentilmente para o estudo (**Anexo 10.1**). Resumidamente, batatas *Solanum tuberosum* são trituradas e fermentadas e, posteriormente, ocorre uma etapa de filtragem que separa uma fração líquida e uma fração sólida (descartada, Fração II), que é composta de bagaço da batata fermentada (**Figura 8**). A empresa produz cerca de um milhão de toneladas/ano de rejeitos, uma média de oitenta mil kg/mês e apenas uma pequena parte é utilizada como ração para suínos e bovinos.



**Figura 8.** Processo de produção do fertilizante do qual se oriunda a Fração II. Fonte: (Sales, NMR, 2017).

### 2.4.3 Composição nutricional da Fração II

Um estudo do grupo envolvendo a avaliação da composição nutricional da Fração II indicou presença significativa de fibras, (23,4g/100g *in natura*), proteínas (5,2g/100g) e lipídeos (0,48g/100g) (dados ainda não publicados). Com relação aos micronutrientes destaca-se o zinco (11,67mg/100g), bem como outros demonstrados na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Comparação entre macro e micronutrientes da Fração II e a batata

Nutrientes	*Fração II	*Batata
<b>Carboidrato</b>	8,00g	18,00g
<b>Proteína</b>	5,20g	2,08g
<b>Lipídeos</b>	0,48g	0,10g
<b>Fibras</b>	23,4g	1,60g
<b>Cálcio</b>	0,08mg	7,00mg
<b>Magnésio</b>	0,04mg	21,00mg
<b>Manganês</b>	0,49mg	0,26mg
<b>Fosforo</b>	0,15mg	46,00mg
<b>Enxofre</b>	0,09mg	0,07mg
<b>Zinco</b>	11,67mg	0,39mg
<b>Potássio</b>	0,54mg	543,00mg

\*100 g de produto *in natura*. **Fonte:** (SALES et al. 2014 (dados ainda não publicados); Philippi, 2002; UniCamp, 2006). Adaptado.

Conforme é possível verificar na **Tabela 9**, não foram encontrados contaminantes como metais pesados (cobre, chumbo, mercúrio, níquel, selênio, cromo, etc.) na Fração II. Este resultado indica uma futura possibilidade de utilização deste resíduo como ração animal ou, até mesmo, para a produção de uma farinha sem glúten e rica em fibras e proteínas (após futuros ensaios para se confirmar a não toxicidade deste produto aos seres

humanos) para a utilização na nutrição humana para auxiliar pacientes como os portadores de doença celíaca, dislipidemias, diabetes *Melittus* ou obesidade, por exemplo.

O desenvolvimento de um método simples e barato para a extração e purificação de  $\beta$ -glucanas da Fração II poderia incentivar a sustentabilidade e o desenvolvimento tecnológico do processo de produção do adubo, pois estimularia o reaproveitamento da Fração II antes descartada na natureza. Ademais, seria uma fonte alternativa de matéria prima para fabricação de produtos nutracêuticos com potencial imunológico.

### 3.0 JUSTIFICATIVA

Polissacarídeos, como as  $\beta$ -glucanas, são amplamente utilizados em produtos terapêuticos e a sua extração a partir da Fração II, poderá ser uma fonte alternativa na geração de novos produtos imunopreventivos ou para a utilização nas indústrias alimentícias.

A extração de moléculas do tipo  $\beta$ -glucanas é definida como uma metodologia onerosa e trabalhosa pois são empregados solventes de custo elevado e em alguns casos tóxicos. Tais procedimentos são amplamente estudados/patenteados devido à importância crescente que as  $\beta$ -glucanas adquiriram no meio científico, nas indústrias alimentícia e farmacêutica, devido ao seu potencial biológico.

O desenvolvimento de uma nova metodologia de extração  $\beta$ -glucanas baseia-se em: (I) não foi encontrado na literatura uma metodologia que descreva a extração das moléculas oriundas de resíduos agroindustriais de batata; (II) aumento acentuado no custo de solventes importados, o qual elevou os custos das técnicas tradicionais de extração; (III) desenvolvimento de um método barato, simples e ambientalmente aceitável para a extração, sem o uso de solventes tóxicos e (IV) o reaproveitamento de um resíduo agroindustrial que seria descartado na natureza.

Assim, o respectivo trabalho é de alta relevância, uma vez que irá contribuir com o desenvolvimento de uma nova metodologia acessível de extração de  $\beta$ -glucanas, bem como demonstra que o reaproveitamento de resíduos industriais, por meio do uso da biotecnologia, pode gerar fontes genuínas de matéria prima.



## 4.0 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia simples e de baixo custo que possibilite a utilização da Fração II (rejeito agroindustrial) para a extração e a purificação de  $\beta$ -glucanas biologicamente ativas

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método de extração e purificação do polissacarídeo  $\beta$ -glucana a partir do resíduo agroindustrial, denominado Fração II.
  
- Quantificar o polissacarídeo  $\beta$ -glucana obtido por meio de ensaio enzimático.
  
- Caracterizar o tipo de polissacarídeo  $\beta$ -glucana obtido utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear.
  
- Avaliar a atividade biológica do polissacarídeo  $\beta$ -glucana obtido por meio de ensaio anti-proliferativo.

## 5.0 METODOLOGIA

### 5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS DO TIPO B-GLUCANAS

Para a extração e purificação das moléculas de  $\beta$ -glucanas um protocolo próprio foi desenvolvido, utilizando métodos químico (etanol a 100%), físico (homogeneização, centrifugação, autoclavagem e sonicação) (em processo de patente). Nenhum protocolo para purificação e extração de moléculas do tipo  $\beta$ -glucanas para resíduo agroindustrial derivado de batata fermentada (Fração II) foi encontrado em bancos de dados e de patentes. Dessa forma, foram feitas adaptações nos métodos propostos por Wood (1978) e aperfeiçoado por Temelli (1997) e Bhatti (1995) com o objetivo de se desenvolver novo protocolo.

#### 5.1.1 Metodologia desenvolvida

50g da Fração II foi homogeneizada em liquidificador da marca Oster, BRLY07-Z00-57, 60Hz, 220V, 600W (México) com 500mL de água destilada, em velocidade máxima, por 5 minutos. O líquido homogêneo foi, posteriormente, transferido para frasco *erlemeyer* de 4L e autoclavado em autoclave da marca Phoenix, vertical (São Paulo - Brasil) por duas vezes consecutivas a 120°C por 120 minutos (para quebra de proteínas). À solução autoclavada, foi adicionado igual volume de etanol a 100%, sendo a amostra incubada a 4°C por 24 horas (para separação de lipídeos). Após esse período, a amostra foi centrifugada em centrífuga Modelo S810R-R, marca *Eppendorf*, (Hamburg, Germany) a 4000rpm por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi incubado em temperatura ambiente por 2 dias em fluxo laminar da marca VECO, modelo BioSeg 09 (Campinas, São Paulo) a fim de se eliminar excessos de água e carboidratos restantes. A amostra (cerca de 32,17g restante dos 50g iniciais) foi, novamente, transferida para frasco *erlemeyer* contendo 1000mL de água destilada e autoclavada por duas vezes nas mesmas condições descritas anteriormente. Depois, a amostra foi sonicada em sonicador vertical da marca BRANSON Digital Sinifier 450, modelo 102C (Danbury, Connecticut, EUA), por 30 minutos, nas condições 10 segundos ON/30 segundos OFF e amplitude de 30%. A

amostra sonicada foi submetida a nova centrifugação a 4000rpm por 20 minutos a 4°C. Dessa vez, o pellet foi descartado e o sobrenadante sofreu precipitação após adição de mesmo volume de etanol a 100% com posterior incubação a 4°C por 24 horas. Após nova centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente, o sobrenadante foi descartado e, ao pellet, foi adicionado 50mL de água destilada. A amostra foi incubada a 100°C em banho-maria da marca AmershamBiosciences, modelo Multitemp III (*Uppsala, Sweden*), por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi resfriada em temperatura ambiente e centrifugada a 4000rpm por 20 minutos a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi liofilizado em liofilizador da marca Analítica, modelo Christ 1,4 Alpha LD *plus (Osterode am Harz, Germany)* por 3 dias.

### 5.1.2 Remoção de lipopolissacarídeo (LPS)

A amostra (100mg) liofilizada foi diluída em 2mL de água Milli-Q. Em seguida foi incubada a 100°C/15 minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 8000rpm/10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi incubado com proteinase K a 0,05% por 1 hora a 60°C. Logo após, a proteinase foi inativada incubando-a a 100°C durante 5 minutos seguido de uma nova centrifugação (5 minutos a 19.000 giros). O sobrenadante foi o lipopolissacarídeo (removido) e o concentrado restante foi de  $\beta$ -glucanas (Westphal e Jann, 1965; Wang, et al., 2010; Davis e Goldberg, 2012). Com modificações.

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DAS MOLÉCULAS PURIFICADAS

O ensaio para a quantificação enzimática foi realizado utilizando a metodologia descrita por McCleary et al., (1985, 1986, 1991) utilizando o kit K-YBGL 09/2009 (Megazyme Internacional Ireland Ltda., Wicklow, U.K) seguindo as instruções do fabricante, conforme descrito abaixo:

Para determinação das glucanas totais, 0,1g  $\pm$ 0,01g da amostra extraída e purificada da Fração II foi pesada. A amostra foi, então, hidrolisada com 1,3mL de HCl e incubada a 100°C durante 2 horas em banho-maria da marca AmershamBiosciences, modelo

Multitemp III. O pH da amostra foi neutralizado com adição de 2mL de KOH. Para determinação das glucanas totais ( $\alpha$  e  $\beta$ ), uma alíquota de 0,1mL de amostra foi digerida com adição de exo-(1-3)- $\beta$ -glucanase ( $100 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e  $\beta$ -glucosidase ( $20 \text{ U.mL}^{-1}$ ) em 200mM de tampão de acetato de sódio (pH 5,0). Os hidrolisados foram incubados com uma mistura de invertase ( $500 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e glicose oxidase ( $> 12.000 \text{ U.L}^{-1}$ ) a  $40^\circ\text{C}$  durante 1 hora. A absorbância da solução foi medida em leitor de placa Elisa da marca Molecular Devices, modelo SpectraMax 190 (*Sunnyvale, EUA*), utilizando o software SoftMax Pro 5, a 510nm. O experimento foi feito em triplicata.

Para determinação de glucanas do tipo  $\alpha$ , amostra pesada ( $0,1\text{g} \pm 0,01\text{g}$ ) foi dissolvidas em 2mL de KOH e hidrolisada, sendo posteriormente adicionadas a 1,2mL de tampão de acetato de sódio (pH 3,8). Depois a amostra foi incubada em banho de gelo sob agitação constante por 20min. Amiloglucosidase ( $1630 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e invertase ( $500 \text{ U.mL}^{-1}$ ) foram adicionadas à solução submetida a uma nova incubação a  $40^\circ\text{C}$  durante 30 min. A alíquota foi, então, incubada com uma mistura de glicose oxidase ( $> 12.000 \text{ U.L}^{-1}$ ) e peroxidase ( $> 650 \text{ U.L}^{-1}$ ), a  $40^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. A absorbância da solução foi medida em equipamento leitor de placa Elisa da marca Molecular Devices, modelo SpectraMax 190 (*Sunnyvale, EUA*) utilizando o software SoftMax Pro 5, a 510nm. O experimento foi feito em triplicata.

A equação utilizada para o cálculo do conteúdo de moléculas do tipo  $\beta$ -glucanas considerou a diferença entre o conteúdo de glucanas totais e glucanas do tipo  $\alpha$ :

$$\text{Glucanas do tipo } \beta\text{-glucanas} = \text{Glucanas totais} - \text{Glucanas do tipo } \alpha$$

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULAS POR RMN

A espectrometria de  $^{13}\text{C}$  RMN e  $^1\text{H}$  RMN em  $\text{D}_2\text{O}$ , das amostras, foi conduzida em um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 600MHz (modelo *Magneto Ascend 600, Console Avance III HD*, da Universidade de Brasília - UNB). As amostras foram pesadas nas concentrações de 50mg e diluída em 600 $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  a 99%. O espectro foi adquirido com sequência de supressão de solvente (zgesgp), 1024 *scans* e intervalo entre *scans* de 1 segundo de acordo com descrito por Young-Teck et al. (2000) e Vaclav and Miroslav (2013). Para obtenção e análise dos espectros de RMN foram utilizados os

programas *TopSpin 3,5p16*, 2016 (*Bruker Corporation, Billerica, EUA*) e o *ACD/Spectrum Processor 2016.1.1 ACD/labs* (*Toronto, Canada*).

#### 5.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.

Para os ensaios de atividade antimicrobiana, foram utilizadas amostras das glucanas totais da Fração II contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli* ATCC, *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina e *Escherichia coli* estirpe clínica.

As cepas de *S. aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) foram obtidas a partir da coleta de microbiologia na Universidade Católica de Brasília, Distrito Federal, Brasil. A cepa *S. aureus* resistente à Meticilina (MRSA 007133623) e *E. coli* (estirpe clínica 3789319) foram isoladas com suporte pelo LACEN (Laboratório Central do Distrito Federal, Brasília, Brasil). Uma colônia individual de cada estirpe bacteriana foi riscada em placas de LB (1% de triptona + 1% de NaCl + 0,5% de extrato de levedura, 1,7% de ágar), pH  $7,0 \pm 0,2$  durante 24 horas.

As macromoléculas de glucanas totais da Fração II foram testadas na concentração de  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$  e solubilizadas em caldo LB. Como pré-cultura, uma única colônia de cada bactéria foi inoculada em 5mL de caldo LB (1% de triptona + 1% de NaCl + 0,5% de extrato de levedura), pH  $7,0 \pm 0,2$ , entre 12 e 16 horas até atingir bactérias em fase logarítmica. Um volume de  $50 \mu\text{L}$  de pré-cultura foi adicionado a um caldo de LB fresco de 5mL para a cultura. O crescimento bacteriano da cultura foi monitorizado a  $595 \text{ nm}$  até a fase intermediária a uma concentração final de  $5.104 \text{ mL}^{-1}$  UFC por poço, de acordo com os Padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). As microplacas contendo uma mistura de amostras, bactérias e caldo LB foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e o crescimento bacteriano foi monitorado a  $595 \text{ nm}$  a cada 30 minutos durante 24 horas, constantemente agitado. Amicacina, Ampicilina e Gentamicina foram utilizados como controle positivo a uma concentração de  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O caldo LB foi usado como controle negativo.

Também foi utilizado Zymosan ( $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) como um controle positivo contra as bactérias *S. aureus* resistente à Meticilina (MRSA 007133623) e *E. coli* (estirpe clínica 3789319), uma vez que na literatura são encontradas referências deste composto e a sua atuação sobre as bactérias (Pizarro, 2014; Vaclav e Miroslav, 2013).

As glucanas totais obtidas da batata *S. tuberosum* ( $50\text{mg.mL}^{-1}$ ) foram usadas como controle negativo para todas as cepas de microrganismos, uma vez que a batata é a matéria prima para a produção do fertilizante do qual é proveniente a Fração II. A batata utilizada não passou pelo processo de produção do adubo, mas passou pela mesma metodologia de extração e purificação das  $\beta$ -glucanas que a Fração II.

A inibição do crescimento bacteriano baseou-se no valor de absorbância a 595nm após 24 horas, que foi seguido em comparação com o valor do controle positivo obtido que dificulta o desenvolvimento de toda a população de bactérias (100%) (Lima et al.,2013). Os ensaios antibacterianos foram realizados através de ensaio de microdiluição utilizando um leitor ELISA para microplacas de 96 poços (Biotek, EUA). Todos os ensaios antibacterianos foram realizados em triplicado. A média de inibição foi calculada com base nas leituras para 0h, 6h, 12h, 18h e 24h, seguido da análise estatística.

## 5.5 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando o software *GraphPad Prism Statistics*, versão 6,1 (São Francisco, EUA).

## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBA, Associação Brasileira da batata. **Cadeia da Batata**. Disponível: <[Http://www.abbabatatabrasileira.com.br](http://www.abbabatatabrasileira.com.br)>. Acessado em 10 de jan. de 2016.
2. Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., Ahmed, Z.. **Extraction and characterization of  $\beta$ -D-glucan from oat for industrial utilization**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 46, p. 304-309, 2010. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.01.002.
3. Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., & Din, A.. **Physicochemical and functional properties of barley  $\beta$ -glucan as affected by different extraction procedures**. International Journal of Food Science and Technology, v. 44, p. 181-187, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01721.x.
4. Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., Kevelaitis E.. **Effects of Beta-glucan on the immune system**. Medicina, Kaunas, v. 43, p. 597-606, 2007. Disponível em <<https://pdfs.semanticscholar.org/b4b6/b6a13654d6460c95044c48b5dbcd062eb217.pdf>>. Acessado em 15 de fev. de 2016.
5. Aleem, E..  **$\beta$ -Glucans and their Applications in Cancer Therapy: Focus on human studies**. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, v. 13, p.709-719, 2013. DOI: 10.2174/1871520611313050005.
6. Amazon. **Beta-glucans**. Disponível em <[www.amazon.com](http://www.amazon.com)>. Acessado em 02 de out. de 2016.
7. Aziabile, E., Tchegueni, S., Bodjona, M. B., Degbe, A. K., Zamama, Hafidi, M., El Meray, M., Kili, K. A.. **Valorization of agro-industrial waste by bioprocess aerobic “composting”**. Journal of Materials and Environmental Sciences, v. 8, p. 1277-1283, 2017. ISSN: 2028-2508. Disponível em <<http://www.jmaterenvirosci.com>>. Acessado em 25 de ago. de 2016.

8. Backes, A. A., Roner, M. N. B., Oliveira, V. S., Ferreira, A. C. D.. **Aproveitamento de Resíduos Sólidos Orgânicos na alimentação Humana e Animal.** Revista da Fapese, v. 3, p. 17-24, 2007. Disponível em [http://www.fapese.org.br/revista\\_fapese/v3n2/artigo2.pdf](http://www.fapese.org.br/revista_fapese/v3n2/artigo2.pdf)>. Acessado em 15 de jun. de 2016.
9. Bahl, A. K., Vercellotti, S. V., Vercellotti, J. R., & Klein, E.. **Methods of purifying Beta-glucans.** 2009. US patent 7550584 B2.
10. Barbosa, A. M.. **Production and Applications of Fungal Exopolysaccharides.** Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 25, p. 29-42, 2004. DOI: 10.4137/MBLS10957.
11. Barreto, S. M., Pinheiro, A. R. O., Sichieri, R., Monteiro, C. A., Batista Filho, M., Schimidt, M. I., Lotufo, P., Assis, A. M., Guimarães, V., Recine, E. G. I. G., Victora, C. G., Passos, V. M. A. . **Analysis of the Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health of the World Health Organization.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 14, p. 41-68, 2005. DOI: 10.5123/S1679-49742005000100005.
12. Beta Glucan Org. **History of Beta-1,3/1,6-Glucan Research.** Disponível em < <http://www.betaglucan.org/history.htm>>. Acessado em 10 de jan. de 2016.
13. Bhatta, R. S.. **Extraction and Enrichment of (1,3),(1,4)  $\beta$ -D-Glucan from Barley and Oat Brans.** Cereal Chem., v. 70, p. 73-77, 1993. Disponível em <[https://www.aacnet.org/publications/cc/backissues/1993/Documents/70\\_73.pdf](https://www.aacnet.org/publications/cc/backissues/1993/Documents/70_73.pdf)>. Acessado em 25 de mar. de 2016.
14. Bhatta, R. S.. **Laboratory and pilot plant extraction and purification of  $\beta$ -glucans from Hull-less barley and oat brans.** J. Cereal Sci., v. 22, n. 1, p. 163-170, 1995. DOI: 10.1016/0733-5210(95)90046-2.
15. Bhatta, R. S.. **Methods for extracting cereal  $\beta$ -glucans.** 1996, US patent 5518710.



16. BIOVEA. **Beta-glucana 100mg 60 Cápsulas**. Disponível em <[https://www.biovea.com/br/product\\_detail.aspx?NAME=BETA-GLUCANO-100mg-60-C%C3%A1psulas&PID=2100](https://www.biovea.com/br/product_detail.aspx?NAME=BETA-GLUCANO-100mg-60-C%C3%A1psulas&PID=2100)>. Acessado em 12 de mai. de 2016.
17. Braga, R. M. M.. **Gestão da Gastronomia: Custos, Formação de preços, Gerenciamento e Planejamento do lucro**. 3ª ed. Editora Senac, São Paulo, 192 p., 2012.
18. C.L.S.I, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twenty-second information supplement, USA, v. 32, p. 188-189, 2012. ISBN 1-56238-804-5. Disponível em <<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100>>. Acessado em 20 de mar. de 2016.
19. Chen, S. N.. **Composite glucan and method for preparing the same**. 2014, US patent 20140031542 A1.
20. Cheung, N. K.. **Therapy-enhancing glucan**. 2013, US patent 20130230535 A1.
21. Colauto N. B., Silveira, A.R., Eira, A.F., Linde, G. A.. **Production flush of *Agaricus blazei* on Brazilian casing layers**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 42: p. 616-623, 2011. DOI: 10.1590/S1517-83822011000200026.
22. Costa, N. M. B. **Biotechnologia aplicada ao valor nutricional dos alimentos**. Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento, n. 32, p.1-8, 2004. Disponível em <<http://www1.esb.ucp.pt/twt/olimpiadasbio07/MyFiles/MyAutoSiteFiles/FontesInformacao253906202/samorais/BiotechnologiaAplicadaValorNutricionalAlimentos.pdf>>. Acessado em 2 de fev. de 2016.
23. Davis, Jr., M.R., Goldberg, J.B. **Purification and Visualization of Lipopolysaccharide from Gram-negative Bacteria by Hot Aqueous-phenol Extraction**. J. Vis. Exp. v. 63, n°. 3916, p. 1-3, 2012. DOI : 10.3791/3916.

24. Dongowski, G. D., DrziKova, B., Senge, B., Blochwitz, R., Gebhardt, E., Habel, A.. **Rheological behaviour of  $\beta$ -glucans preparations from oat products**. Food Chem., v. 93, n. 2, p. 279-291, 2005. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.051.
25. Du, B., Zhu, F. M., & Xu, B. J..  **$\beta$ -Glucan extraction from bran of hull-less barley by accelerated solvent extraction combined with response surface methodology**. Journal of Cereal Science, v. 59, p. 95-100, 2014. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.11.004.
26. Estação verde. **Produtos**. Disponível em <[www.estacaoverdeprodutosnaturais.com](http://www.estacaoverdeprodutosnaturais.com)>. Acessado em 20 de fev. de 2016.
27. FAO, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **Carbohydrates in human nutrition**. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/W8079E/W8079E00.htm>>. Acessado em 10 de jun. de 2016. ISBN 92-5-104114-8.
28. Fengmei, Z., Bin, D., Baojun, X.. **A critical review on production and industrial applications of  $\beta$ -glucans**. Food Hydrocolloids, v. 52, p. 275-288, 2016. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.07.003.
29. Fernandes, F., Pereira, A., Germani, J., Oiano-Neto, J. R.. **Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum*)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, p. 56-65, 2008. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v28s0/10.pdf>>. Acessado em 15 de jun. de 2016.
30. Gallo, L. A., & Basso, L. C. **Fundamentos de Bioquímica para Ciências Biológicas, Ciências dos Alimentos, Agronômicas e Florestais**. São Paulo, Universidade de São Paulo, Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ), 149 p., 2012. Disponível em <[docentes.esalq.usp.br/luagallos/apostila%20teorica.pdf](http://docentes.esalq.usp.br/luagallos/apostila%20teorica.pdf)>. Acessado em 10 de mai. de 2016.

31. Gallo, L. A.. **Carboidratos**. Disponível em <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/carboidratos>>. Acessado em 10 de fev. de 2016.
32. Garcia, E. L. **Composição dos tubérculos, extração e caracterização de amidos de diferentes cultivares de batata**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 82 p., 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/90677>>. Acessado em 15 fev. de 2016.
33. Georing, K. J., & Eslick, R. F.. **Production of Beta-glucan, bran, protein, oil and maltose syrup from waxy barley**. 1988, US patent 4804545.
34. Gudiña, E.J., Rodrigues, A.I., de Freitas, V., Azevedo, Z., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R.. **Valorization of agro-industrial wastes towards the production of *Rhamnolipids***. *Bioresource Technology*, p. 2-32, 2016. DOI:10.1016/j.biortech.2016.04.027.
35. Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Otterdijk, R. V., Meybeck, A.. **Global food losses and food waste: Extent, causes and prevention**. FAO, 2011. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>>. Acessado 07 de mai. de 2017.
36. Hertzog, C. **Beta-glucan: A 21st century miracle?** 1 ed. Booksmango - USA, 2013. ISBN 978616222265-8.
37. Hornak, J. P.. **The Basics of NMR**. Disponível em <<https://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>>. Acessado em 25 de ago. de 2016.
38. Kabasakal, L., Sener, G., Balkan, J., Dogru-Abbasoglu, S., Keyer-Uysal, M., Uysa, M.. **Melatonin and beta-glucan alone or in combination inhibit the growth of dunning prostatic adenocarcinoma**. *Oncol Res.*, v. 19, p. 259-63, 2011. DOI: 10.3727/096504011X13021877989748.
39. Kelly, G. E.. **Novel therapeutic uses of glucan**. 2006, US patent 20060293278 A1.

40. Kernodle, D. S., Gates, H., Kaiser, A.B. (1998). **Prophylactic Anti-Infective Activity of Poly-[1-6]- $\beta$ -D-Glucopyranosyl [1-3]- $\beta$ -D-Glucopyranose Glucan in a Guinea Pig Model of *Staphylococcal* Wound Infection.** *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 9-545. Disponível em <<http://aac.asm.org/content/42/3/545.long>>. Acessado em 02 de mai. de 2016.
41. Kim, M. S., Park, Y. D., & Lee, S. R.. **Preparation method of Beta-glucan from *Schizophyllum commune* and composition for experimental application comprising the same.** 2008, US20080160043 A1.
42. Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystroem, M.. **Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations.** *Bioresource Technology*, v.87, p.167–198, 2003. DOI:10.1016/S0960-8524(02)00167-0.
43. Lee, S. C.. **Determination of total, soluble, and insoluble, dietary fiber in foods - enzymatic 10 gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study.** *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 75, p. 395-416, 1992. Disponível em <[http://www.nutrientdataconf.org/pastconf/ndbc17/8-2\\_lee.pdf](http://www.nutrientdataconf.org/pastconf/ndbc17/8-2_lee.pdf)>. Acessado em 03 de jun. de 2016.
44. Li, J. Z.. **Dietary Mushroom Intake May Reduce the Risk of Breast Cancer: Evidence from a Meta-Analysis of.** *PLoS ONE*, v. 9, p.1-8, 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0093437.
45. Liang, J., Melican, D., Cafro, L., Palace, G., Fisette, L., Armstrong, R., Patchen, M. L.. **Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity.** *Int J Immunopharmacol*, v. 20, p. 595-614, 1998. DOI: 10.1016/S0192-0561(98)00007-1.
46. Lima, L. A., Mogliolo, L., Castro, C. B., Pires, D. O., Lopez-Abarratequi, C., Goncalves, E. F., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., Otero-Gonzalez, A. J., Franco, O. L.. **Identification of a novel antimicrobial peptide from Brazilian coast coral**

*Phyllogorgia dilatata*. Protein & Peptide Letters, v. 20, p. 1153–1158, 2013. DOI:10.2174/0929866511320100010.

47. Magnani, M. C. G..  **$\beta$ -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining**. Ciências Agrárias, Londrina, v. 29, n.3, p. 631-650, 2008. DOI:10.5433/1679-0359.2008v29n3p631.

48. Manson., R.. **What is Beta-glucan? A Concise Guide to the Benefits and Uses of the Most Powerful Natural Immune Enhancer Known to Science**. USA, Safe Goods Publishing, 51p., 2011. ISBN: 1-884820-66-2.

49. Many, J. N., Vizhi, K.. **Analysis of Different Extraction Methods on the Yield and Recovery of  $\beta$ -Glucan from Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)**. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, v. 1, p. 1-6, 2014. Disponível em <[http://ijiset.com/v1s6/IJSET\\_V1\\_I6\\_44.pdf](http://ijiset.com/v1s6/IJSET_V1_I6_44.pdf)>. Acessado em 15 de jun. de 2016.

50. McCleary, B. V., DeVries, J., Cohen, G., Proski, L., Mugford, D. C., Champ, M., Okuma, K.. **Determination of Total Dietary Fiber (CODEX Definition) by Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study**. *Journal of AOAC International*, v. 93, p. 1-14, 2010. DOI: DOI: 10.5740/jaoacint.CS2011\_25.

51. McCleary, B. V., Glennie H. M.. **Enzymic Quantification of (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glucan in Barley and Malt**. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 91, p. 285-295, 1985. DOI:10.1002/j.2050-0416.1985.tb04345.x.

52. McCleary, B., Codd, R.. **Measurement of (1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glucan in Barley and Oats: A Streamlined Enzymic Procedure**. *Journal of Food Science and Agriculture*, v. 55, p. 303-312, 1991. DOI:10.1002/jsfa.2740550215.

53. McCleary, B., Nurthen, E.. **Measurement of (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glucan in Malt, Wort and Beer**. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 92, p. 168-173, 1986. DOI:10.1002/j.2050-0416.1986.tb04392.x.

54. Megazyme International Ireland. **Total Dietary Fiber, Assay Procedure**. Disponível em <[https://secure.megazyme.com/ booklet/k-tdfr\\_data.pdf](https://secure.megazyme.com/booklet/k-tdfr_data.pdf)>. Acessado em 23de ago. de 2015.
55. Min, S. S., Suyong, L., Kwang, Y. L., Hyeon, G. L. 2005. **Structural and Biological Characterization of Aminated Derivatized Oat,Glucan**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 5554–5558, 2005. DOI:10.1021/jf050273j.
56. Mira, G., Graf, H., Cândido, L. M.. **Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 1, p. 2-10, 2009. Disponível em <<http://www.ufvjm.edu.br/disciplinas/dcb050/files/2014/09/Vis%C3%A3o-retrospectiva-em-fibras-alimentares-no-tratamento-do-diabetes-2.pdf>>. Acessado em 15 de set. de 2016.
57. Morgan, K. R..  **$\beta$ -Glucan products and extraction process from cereals**. 2002, US patent 0192770 A1.
58. Novak, M. V, Synytsya, A., Gedeon, O., Procházka, V., Synytsya, A., Blahovec, J., Hejlová, A., Čopíková, J.. **Yeast  $\beta$ -(1,3)-(1,6)-D-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical**. Carbohydrate Polymers, v. 87, p. 2496-2504, 2012. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.11.031.
59. Novak, M. V.. **Glucans as biological response modifiers**. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders and Drug Targets, v. 9, p. 67-75, 2009. DOI:10.2174/187153009787582423.
60. Onderdonk, A. B. Cisneros, R. L., Hinkson, P., Ostroff, G.. **Anti-Infective Effect of Poly-1,3-6-Glucotriosyl-1,3-Glucopyranose Glucan *In Vivo***. Infection and Immunity. p. 1642-1647, 1992. Disponível em <<http://iai.asm.org/content/60/4/1642.long>>. Acessado em 2 de mai. de 2016.

61. Pão de Açúcar. **Aveia em flocos**. Disponível em <<https://www.paodeacucar.com/busca?w=aveia%20em%20flocos>>. Acessado em 10 jun. de 2016.
62. Philippi, S. T.. **Tabela de composição de alimentos: Suporte para decisão Nutricional**. São Paulo, Metha p. 8, 2002. ISBN: 85-904286-1.
63. Pizarro, R. S.  **$\beta$ -glucans: what types exist and what are their health benefits?** Chilean Nutrition Magazine, v. 41, p. 439-445, 2014. DOI:10.1155/2012/851362.
64. Redmond, M. J., & Fielder, D. A.. **Extraction and purification method for cereal beta-glucan**. 2006, US patent 012149 A1.
65. Rosa, M. F.; Souza Filho, M S. M.; Figueiredo, M. C. B.; Morais, J. P. S.; Santaella, S.T., Leitão, R.C.. **Valorização de resíduos da agroindústria**. II SIGERA, Foz do Iguaçu, p. 98-105, 2011. Disponível em <<http://www.sbera.org.br/2sigera/obras/p12.pdf>>. Acessado em 19 de out. de 2016.
66. Sabio, R. P., Garcia, J. B., Nunes Duarte, E., Pacheco, A. L. A.. **A vez dos HFS Feios: A moda europeia de promover frutas e hortaliças "feias" pode pegar no Brasil**. HortiFrutiBrasil, 2015. Disponível em < <http://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/a-vez-dos-hfs-feios.aspx>>. Acessado em 10 de jun. de 2016.
67. Sanseverino, A. M.. **Clean organic synthesis**. New Chemistry, v. 23, p. 102-107, 2000. DOI: 10.1590/S0100-40422000000100018.
68. Sartorelli, D. S., & Cardoso, M. A.. **Associação Entre Carboidratos da Dieta Habitual e Diabetes Mellitus Tipo 2: Evidências Epidemiológicas**. Arq. Bras. Endocrinol Metab, vol v. 50, p. 1-12, 2006. DOI: 10.1590/S0004-27302006000300003.
69. Sigma Aldrich. **Zymozan**. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acessado em 05 de mai. de 2016.

70. Silva, M. D. **Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas.** Quim. Nova, v. 29, p. 85-92, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000100017.
71. Solomons, G., & Fryhle, C. B.. **Química Orgânica.** Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 8ª ed. 543p., 2006.
72. Stuelp-Campelo, P. M., Oliveira, M. B. M., Leão, A. M. A. C., Carbonero, E. R., Gorin, P. A. J., Lacomini, M.. **Effect of a soluble  $\alpha$ -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity.** International Immuno pharmacology, v. 2, p. 691–698, 2002. DOI: 10.1016/S1567-5769(02)00003-6.
73. Sutherland, I. W.. **Novel and established applications of microbial polysaccharides.** Trends in Biotechnology, Limerick, v.16, p. 41-46, 1998. DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01139-6.
74. Synytsya, A, Novak, M.. **Role of (1,3)-(1,4)- $\beta$ -Glucan in Cell Walls: Interaction with Cellulose.** Annals of Translational Medicine, v. 2, p. 1-14, 2014. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07.
75. Tanioka, A; Hayama, K; Mitsuya, M; Tansho, S; Ono, Y; Tsubaki, K; Abe, S. **Effect of oral administration of  $\beta$ -D-glucan from *Aureobasidium pullulans* ADK-34 on *Candida* and MRSA infections in immunosuppressed mice.** Med Mycol J. v. 53 p. 41-8, 2012. ISSN 2185—6486.
76. Temelli, F.. **Extraction and functional properties of barley B-glucan as affected by temperature and pH.** Journal of Food Science, v. 62, p. 1194–1198, 1997. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb12242.x.
77. Tian, Y. T., Zeng, H. L., Xu, Z. B., Zheng, B. D., Lin, Y. X., Gand, C. J.. **Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*).** Carbohydrate Polymers, v. 88, p. 522-529, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.12.042.



78. Teixeira, S., Milet, Z., Carvalho, J., Biscontini, T. M.. **Administração Aplicada Unidades de Alimentação e Nutrição**. Atheneu, São Paulo, 219 p., 2007.
79. UniCamp. **Tabela TACO**. Disponível em <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>>. Acessado em 30 de nov. de 2016.
80. Vaclav, V. (2009). **Beta glucan: Nature's Secret**. Kindle Book, Louisville, Kentucky, 121 p. 2009.
81. Vaclav, V.. **Glucan immune stimulant adjuvant potential drug**. The World Journal of Clinical Oncology, v. 10, p. 115-119, 2011. DOI:10.5306/wjco.v2.i2.115.
82. Vaclav, V., Miroslav, N. **Biology and Chemistry of Beta Glucan: Beta-Glucan, Structure, Chemistry and Specific Application**. Canada: Bentham Science Publishers, p. 1-258, 2013. DOI:10.2174/97816080526081130201.
83. Vaclav, V., Josef, R., Vlastimil, K., Jitka, P., Ivana, S., Rajnohova, D. L., R. D., Andrea, V., Dalibor, J.. **Effects of  $\beta$ -glucans on benign hyperplasia of prostate**. V. 2, p. 1-4, 2014. DOI: 10.7243/2052-7896-2-8.
84. Vaclav. V., Terayama, K., Mandeville, R., Brousseau, P., Kournikakis, B., Ostroff, G.. **Pilot Study: Orally Administered Yeast  $\beta$ -1,3-glucan Prophylactically Protects Against Anthrax Infection and Cancer in Mice**. Journal on Nutraceuticals and Nutrition, v. 5, p. 1-10, 2002. Disponível em <[http://www.betaglukan.cz/data/citace\\_83.pdf](http://www.betaglukan.cz/data/citace_83.pdf)>. Acessado em 29 de ago. de 2016.
85. Wadhwa, M., Bakshi, M. P. S.. **Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products**. FAO, 2014. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/018/i3273e/i3273e.pdf>>. Acessado em 07 de out. de 2017.

86. Wal-Mart. **Cogumelo *Agaricus blazei***. Disponível em <<https://www.walmart.com.br/cogumelo-120-capsulas-400mg-agaricus-blazei-murril-unilife/2808146/pr>>. Acessado em 20 de jun. de 2016.
87. Wang, X.; Zhang, C.; Shi, F.; Hu, X.. **Purification and characterization of lipopolysaccharides**. Subcell Biochem, v. 53, p. 27-51, 2010. DOI: 10.1007/978-90-481-9078-2\_2.
88. Wang, J.-L., Bi, Z., Zou, J.W., Gu, X. M.. **Combination therapy with lentinan improves outcomes**. Molecular Medicine Reports, v. 5, p. 745-748, 2012. DOI: 10.3892/m m r. 2011.718.
89. Wannmacher, Lenita. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?** ANVISA, Brasília, v. 1, p.1-6, 2004. ISSN 1810-0791.
90. Westphal, O., Jann, K.. **Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol water and further applications of the procedure**. In: Whistler, R.L., Wolfan, M.L.. Methods in Carbohydrate Chemistry. New York, Academic press, p. 83–91, 1965.
91. Whitehead, A.. **Cholesterol-lowering effects of oat b-glucan: a meta-analysis of**. Am J Clin Nutr, v. 100, p. 21-1413, 2014. DOI: 10.3945/ajcn.114.086108.
92. WHO, World Health Organization. **Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health**. Disponível em <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=15967&Itemid=270](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=15967&Itemid=270)>. Acessado em 02 de fev. de 2017.
93. WHO. World Health Organization. **Dietary recommendations/Nutritional requirements**. Disponível em <<http://www.who.int/nutrition/topics/nutrecomm/en/>>. Acessado em 02 de fev. de 2016.

94. Williams, D., Sherwood, E., Browder, I., McNamee, R., Jones, E., Rakinic, J., Di Luzio, N.. **Effect of glucan on neutrophil dynamics and immune function in *Escherichia coli* peritonitis.** J Surg Res., v. 44, p. 54-61, 1998. DOI: 10.1016/0022-4804(88)90122-9.
95. Wood, P. J., Siddiqui, I. R., Paton, D.. **Extraction of high-viscosity gums from oats. Cereal Chemistry.** Cereal Chemistry, v.55, p.1038-1049, 1978. Disponível em <[https://www.aacnet.org/publications/cc/backissues/1978/Documents/chem55\\_1038.pdf](https://www.aacnet.org/publications/cc/backissues/1978/Documents/chem55_1038.pdf)> . Acessado em 15 de nov. de 2016.
96. Young-Teck, K., Eun-Hee, K., Chaejoon, C., David, L. W., Chan-Wha, K., Seung-Taik, L.. **Structural characterization of  $\beta$ -D-(1-3, 1-6)-linked glucans using NMR spectroscopy.** Carbohydrate Research, v. 328, p. 331–341, 2000. DOI:10.1016/S0008-6215(00)00105-1.
97. Zhang, M., Huang, J., Xie, X., & Holman, C.. **Dietary intakes of mushrooms and green tea combine to reduce the risk of breast.** Int. J. Cancer, n.124, p.1404-1408, 2009. DOI: 10.1002/ijc.24047.
98. Zhaoa, G., Kan, J., Li, Z., Chen, Z.. **Characterization and immunostimulatory activity of an (1→6)- $\alpha$ -D-glucan from the root of *Ipomoea batatas*.** International Immunopharmacology, v. 5, p. 1436–1445, 2005. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.03.012.
99. Zhu, Fengmei; Du, Bin; Xu, Baojun. **A critical review on production and industrial applications of Beta-glucanos.** Food Hydrocolloids, v. 52, p. 275-288, 2016. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.07.003
100. Zimerman, Ricardo Ariel. **Uso Indiscriminado de Antimicrobianos e Resistência Microbiana.** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, n.3 p.1-12, 2010. Disponível em <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&view=download&alias=1348-uso-indiscriminado-antimicrobianos-e-resistencia-microbiana-boletim-n-03-](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=1348-uso-indiscriminado-antimicrobianos-e-resistencia-microbiana-boletim-n-03-)

8&category\_slug=uso-racional-medicamentos-685&Itemid=965>. Acessado em 10 de jun. de 2016.

## **7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.1 ARTIGO**

REUTILIZATION OF DISCARDED FERTILIZER RESIDUE FOR  $\beta$ -GLUCAN  
ISOLATION

SALES, N.M.R.<sup>a</sup>, PELEGRINI, P.B.<sup>b</sup>, OLIVEIRA, A. L.<sup>c</sup>, BASSO, A.M.M.<sup>d</sup>, ITO, M.K.<sup>a</sup>,  
GROSSI-DE-SA, M. F.<sup>d, e, f,\*</sup>

Submitted on 29.08. 2017 in Journal Food and Bioproducts Processing (Elsevier)

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Human Nutrition, Brasilia Federal University, Brasília, DF, Brazil.

<sup>b</sup> Diagene Biotechnology, SCS, 01, A, 70.300-910, Brasília – DF, Brazil.

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, Brasilia Federal University, Brasília, Brazil.

<sup>d</sup> Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil.

<sup>e</sup> Post Graduation Program in Genomic Science and Biotechnology, Catholic University of Brasilia, Brasília, DF, Brazil.

<sup>f</sup> Post Graduation Program in Biotechnology, University Potiguar, Natal, RN, Brazil.

\*Corresponding author at: fatima.grossi@embrapa.br (Grossi-de-Sa, M.F.)

Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, PqEB, Av. W5 North, PO Box 02372, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brazil.

Phone: 55 (61) 3448-4702

Fax: 55 (61) 3448-4702

---

Abbreviations: %, Percentage; <sup>13</sup>C NMR, Nuclear Magnetic Resonance with carbon 13 marking; <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>Carbon; <sup>15</sup>N, <sup>15</sup>Nitrogen; <sup>19</sup>F, <sup>19</sup>Fluor; <sup>19</sup>P, <sup>19</sup>Phosphorus; <sup>1</sup>H NMR, Nuclear Magnetic Resonance with hydrogen 1 marking; <sup>1</sup>H RMN, Nuclear Magnetic Resonance with Hydrogen 1 marking; <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>Hydrogen; C+, This positive control, Gentamicin, Ampicilin, Amikacin, Zymosan and glucans total of Solanum tuberosum potato; C-LB, This negative control. Luria-Bertani culture medium, composed of Tryptone (10 g), yeast extract (5 g), sodium chloride (10 g); D<sub>2</sub>O, Deuterated water; FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations; MHz, Megahertz, a frequency unit that is equivalent to one million hertz (cycles per second); NaOH, Hydroxide de sodium; ppm, Chemical displacement, measure the distance between the measured signal and the reference signal; UN, United Nations;  $\alpha$ , International alpha symbol;  $\beta$ , International beta symbol.

**ABSTRACT:** The United Nations conducts programmes in the areas of industrial development and the environment that aim at the reduction and reuse of residue. One possible way to recycle waste is the employment of economically viable methodologies that use discard residues to new technological products, such polysaccharide.  $\beta$ -glucans are polysaccharides from yeasts, mushrooms, rye and oats, and their bioactive properties, including antimicrobial, anti-infective, anti-inflammatory, anti-hypercholesterolemia chemo-protective, anticancer and immunostimulatory activities, have been described as among the greatest discoveries in biological science. Therefore, this study has developed a new, simple, and low-cost methodology for  $\beta$ -glucan isolation from fertilizer residue, specifically Fraction II. Physical and chemical procedures were developed for the extraction and purification of  $\beta$ -glucans, which yielded 7.3 g of total glucans and 6.9 g of  $\beta$ -glucans. The carbohydrate isolation was confirmed by nuclear magnetic resonance and enzymatic quantification analyses, and microbiological assays showed the bacterial inhibition of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*). The methodology described in this work was less expensive than other approaches reported in the literature, and this study showed that  $\beta$ -glucan recycling is a potential source of microbiological activity.

**Keywords:** recycling residues, extraction protocol,  $\beta$ -glucans.

## 1. Introduction

$\beta$ -Glucans are non-starch polysaccharides with glucose units and carbon interactions that can be classified as  $\beta$ -D-glucopyranose (1,3),  $\beta$ -D-glucopyranose (1,3)-(1,4) or  $\beta$ -D-glucopyranose (1,3)-(1,6) (Vaclav and Miroslav, 2013; Upadhyay et al., 2017). The  $\beta$ -(1,3) and  $\beta$ -(1,3)-(1,6) glucans with  $\beta$ -D-glycosidic bonds can be found in fungi, yeast, and bacteria in both insoluble and soluble forms (Vaclav and Miroslav, 2013; Upadhyay et al., 2017). However,  $\beta$ -(1,3)-(1,4)  $\beta$ -D-glycosidic bonds are commonly found in cereals such as oats, barley, rye, sorghum, and maize, and only in soluble fibres (Vaclav and Miroslav, 2013; Pizarro, 2014).  $\beta$ -Glucans have different physical properties including thickening, stabilization, emulsification, and gelling (Fengmei et al., 2016). Due to these characteristics,  $\beta$ -glucans are used as components in ointments, eye drops, dressings, and food supplies, as well as in the food industry (sausages, gluten-free bread, snacks, and drinks) and cosmetics (lotions, creams, and moisturizers) (Fengmei et al., 2016). Studies have demonstrated the importance of these molecules as preventive agents against several chronic non-communicable diseases, mainly dyslipidaemia, diabetes, and cancer, and they can also act in the immune system against opportunistic infections (Akramiene, 2007; Vaclav, 2009; Vaclav and Miroslav, 2013; Upadhyay et al., 2017). Fraction II is obtained from an organic fertilizer that is a residue of the *Solanum tuberosum* fermentation process (Patent in progress).

The residue can be of domestic, urban origin or from industry or agro-industry (Sanseverino, 2000; Fernandes et al., 2008; Aziabile et al., 2017). The materials, due to the large volume generated, can constitute a serious environmental problem (Sanseverino, 2000; Fernandes et al., 2008; Gustavsson et al., 2011, Aziabile et al., 2017). For this reason, the United Nations and the Food and Agriculture Organization of the United Nations have supported the development of projects to reduce and reuse these residues (Gustavsson et al., 2011; Wadhwa et al., 2014). Within this concept, Laufenberg et al. (2003), Gudiña et al. (2016), and Aziabile et al. (2017) demonstrated some examples of the reuse of residues as raw materials with potential biotechnological tools. Therefore, this study proposes the development of a simple and low-cost method for the extraction and purification of  $\beta$ -glucans from Fraction II as a potential biotechnological tool. Such methodologies have been extensively studied/patented due to the increasing importance of  $\beta$ -glucans in the scientific and market environment for their anticancer, antiglycemic, and anticholesterolemic potencies, their functions as immunomodulators of the immune system



and their use as raw materials in the food and beverage industries (Vaclav and Miroslav, 2013; Pizarro, 2014; Whitehead, 2014; Upadhyay et al., 2017).

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Extraction and purification of $\beta$ -glucans**

Using chemical (100% ethanol), physical (grinding, centrifugation and autoclaving), and sonication methods, 100 g of Fraction II (Patent in progress) was homogenized in a blender with 1000 mL of distilled water at full speed for 5 min. The homogeneous liquid was moved to a 4 L flask and autoclaved (model Phoenix, São Paulo, Brazil) twice at 120°C for 2 hours. An equal volume of 100% of ethanol was added to this autoclaved solution, and the sample was incubated at 4°C for 24 h. Afterwards, the sample was centrifuged at 269 x g for 20 min at 4°C, and the supernatant was removed. The pellet was incubated at room temperature for 2 days in a laminar flow to eliminate excess water. The sample was relocated to a flask containing 1 L of distilled water and autoclaved twice, as described previously. Then, the sample was sonicated for 30 min (BRANSON Digital Sonifier 450, model 102C, Danbury, Connecticut, set to 10 sec/ON and 30 sec/OFF and 30% amplitude). The sonicated sample was centrifuged at 269 x g for 20 min at 4°C. In this step, the pellet was discarded, and the supernatant was precipitated after the addition of the same volume of 100% ethanol and incubation at 4°C for 24 h. After centrifugation under the same conditions previously described, the supernatant was discarded, and 50 mL of distilled water was added to the pellet. The sample was incubated at 100°C in a water bath for 20 min. The sample was cooled to room temperature and centrifuged at 269 x g for 20 min at 4°C. After supernatant removal, the pellet was lyophilized (Christ, model 1,4 Alpha LD plus, Osterode, Germany) for 3 days. *Solanum tuberosum* was used as a control.

### **2.2 Quantification method**

The  $\beta$ -D-glucan assay was according by Vaclav and Miroslav (2013) and the manufacturer's kit instructions (Megazyme, 2015). In addition, the method is in agreeing of Association of Official Analytical Chemists (methods 985.29, 991.42, 991.43 and 993.19), and American Association for Clinical Chemistry (methods 32-05.01, 32-06.01, 32-07.01 and 32-21.01).

### 2.3 Nuclear Magnetic Resonance

Fifty-milligram samples of the total glucans in Fraction II and of the total glucans in the potato *S. tuberosum* were diluted in 600  $\mu\text{l}$  of  $\text{D}_2\text{O}$ , as described by Young-Teck et al. (2000). The Spectra were obtained using a Bruker Avance III HD spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, EUA) operating at the  $^1\text{H}$  frequency of 600 MHz. The spectra were acquired with a solvent suppression sequence (zgesgp), 1024 scans and a 1 sec scan interval. For analysis of the NMR spectra, the software programs TopSpin 3.5p16, 2016 (Bruker Corporation, Billerica, EUA) and ACD Laboratories ACD/Spectrus 2016.1.1 (Toronto, Canada), which was according to Young-Teck et al. (2000) and Vaclav and Miroslav (2013).

### 2.4 Antibacterial Assays

The antibacterial activity assays was based in Min et al. (2005) and C.L.S.I. (2012), with adaptations. Total glucan molecules at a concentration of  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , solubilized in LB broth, were applied to *S. aureus* ATCC, *E. coli* ATCC, methicillin-resistant *S. aureus* and an *E. coli* clinical strain. The *S. aureus* (ATCC 29213) and *E. coli* (ATCC 8739) strains were obtained from the microbiology collection at the Catholic University of Brasília, Federal District, Brazil. Methicillin-resistant *S. aureus* (clinical strain MRSA 007133623) and *E. coli* (clinical strain 3789319) were isolated with the support of LACEN (Central Laboratory of Distrito Federal, Brasília, Brazil). An individual colony of each bacterial strain was streaked on LB plates (1% tryptone + 1% NaCl + 0.5% yeast extract; 1.7% agar) at  $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$  for 24 h.

For pre-culturing, a single colony of each bacterial strain was inoculated in 5 mL of LB broth (1% tryptone + 1% NaCl + 0.5% yeast extract),  $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ , for between 12 h and 16 h until the bacteria achieved logarithmic-phase growth. A volume of 50  $\mu\text{L}$  of pre-culture was added to a fresh 5 mL LB broth for the culture. The bacterial growth of the culture was monitored at 595 nm until the mid-log phase at a final concentration of  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  UFC per well, according to CLSI Standards (CLSI, 2012). Microplates containing a mix of samples, bacteria and LB broth were incubated at  $37^\circ\text{C}$ , and the bacterial growth was monitored at 595 nm every 30 min for 24 h under constant shaking.

Amikacin (used against the *E. coli* clinical strain), ampicillin (used against *S. aureus* ATCC) and gentamicin (used against *E. coli* ATCC and methicillin-resistant *S. aureus*) were used as positive controls at a concentration of  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Zymosan (Sigma-

Aldrich, Z4250-250MG) and the total glucans of the potato *S. tuberosum* (50 mg.mL<sup>-1</sup>) were used as positive controls. LB broth was used as a negative control. The inhibition of bacterial growth was based on the absorbance at 595 nm after 24 h, which was directly related to the value of the positive controls that hindered the development of the whole bacteria population (100%) (Lima et al., 2013). The antibacterial assays were performed through a microdilution assay using an ELISA reader for 96-well microplates (Biotek, USA). All antibacterial assays were performed in triplicate. The average inhibition was calculated based on measurements taken at 0 h, 6 h, 12 h, 18 h and 24 h and followed by statistical analysis.

### **2.5 Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Statistics, version 6.1 (California, USA) (Maxwell et al., 2007).

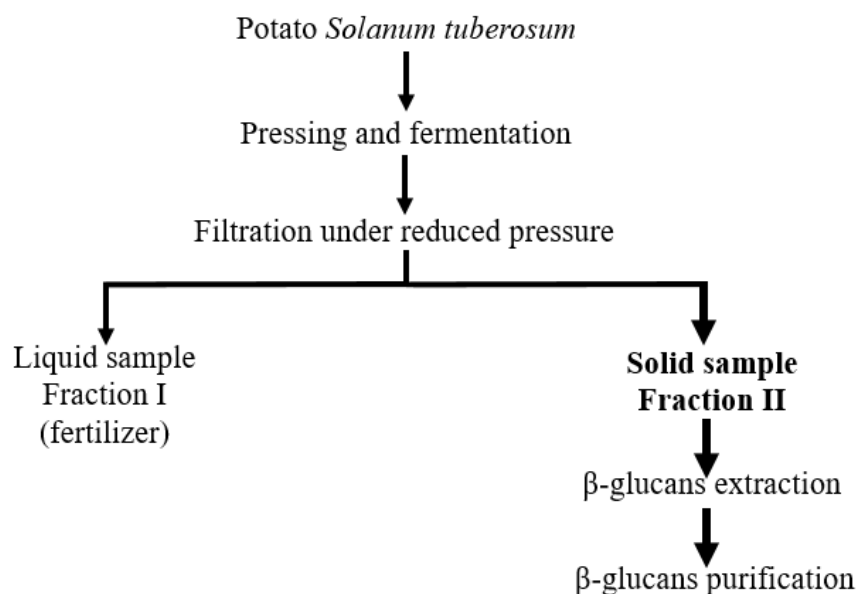
### **3. Theory**

The reuse of Fraction II, a solid residue from the process of manufacturing a fertilizer, can be used for biotechnological purposes.

### **4. Results**

#### **4.1 Extraction and purification**

After the extraction of 100 g of Fraction II, 10.5 g total weight of the isolated fraction was obtained. After purification, 7.3 g of total glucans was obtained. For the potato sample, 100 g of raw material produced 5.1 g of polysaccharides, and after purification, 3.4 g of total glucans was obtained. **Fig. 1** describes the process of the extraction and purification of the glucans from Fraction II and from potato, as described in the methodology.



**Figure 1** - Fraction II source illustrative scheme.

#### 4.2 Enzymatic quantification

Enzymatic quantification of the Fraction II extract showed 7.3 g of total glucans, of which 6.9 g were  $\beta$ -glucans and 0.4 g were  $\alpha$ -glucans. The *Solanum tuberosum* extraction contained 3.4 g of total glucans, of which 3.3 g was  $\beta$ -glucans and 0.1 g was  $\alpha$ -glucans (Table 1).

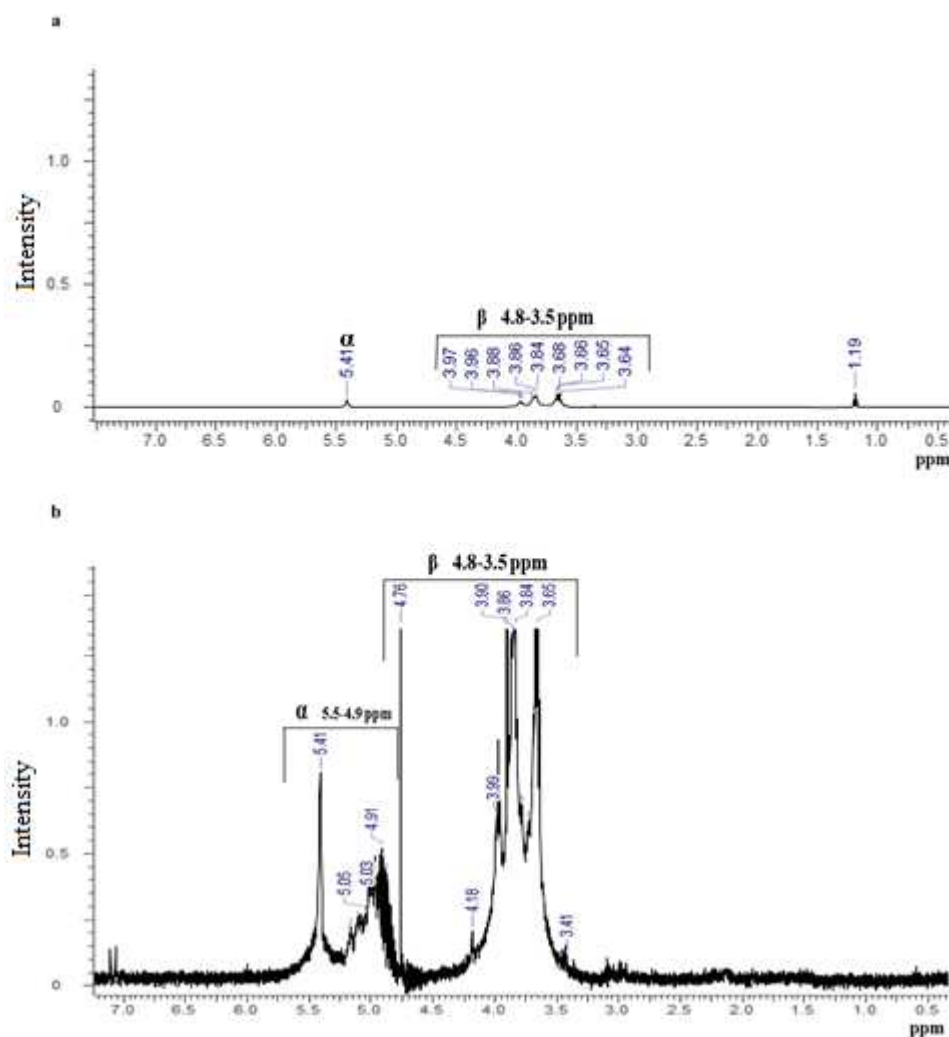
**Table 1.** Total glucans enzymatic quantification from Fraction II and *Solanum tuberosum*.

Sample	Total glucans (%)	$\alpha$ -glucans (%)	$\beta$ -glucans (%)
*Fraction II	69.5	5.5	94.5
* <i>Solanum tuberosum</i>	66.6	2.9	97.0

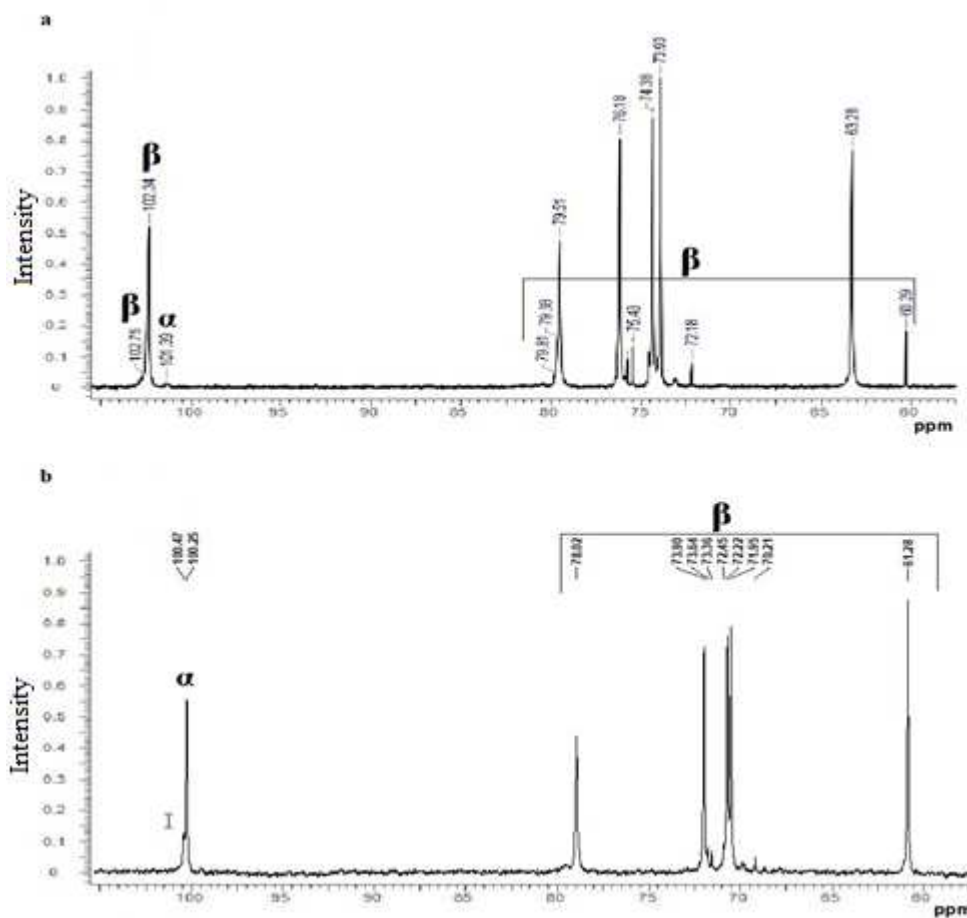
\* Sample of 100 g *in natura*. Triplicate assay.

### 4.3 Nuclear Resonance Magnetic

The  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 2) and  $^{13}\text{C}$  NMR (Fig. 3) analyses showed typical polysaccharide signals for the total glucans from the Fraction II sample diluted in  $\text{D}_2\text{O}$  and for the  $\beta$ -glucans (peaks between 104-102 ppm and 90-60 ppm), and analysis of the spectrum confirmed the structural features previously reported for  $\beta$ -glucans.



**Figure 2.** Comparative analysis between  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz)  $\text{D}_2\text{O}$  spectra of the total glucans in Fraction II and of the control (potato total glucans). **a:**  $^1\text{H}$ -NMR of the total glucans of Fraction II showing spectral changes characteristic of the molecular structures of  $\alpha$ -glucans and  $\beta$ -glucans. **b:**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (600 MHz) in  $\text{D}_2\text{O}$  of the control showing spectra with the molecular structures of  $\alpha$  and  $\beta$ -glucans (Beta-glucans). Duplicate assay.



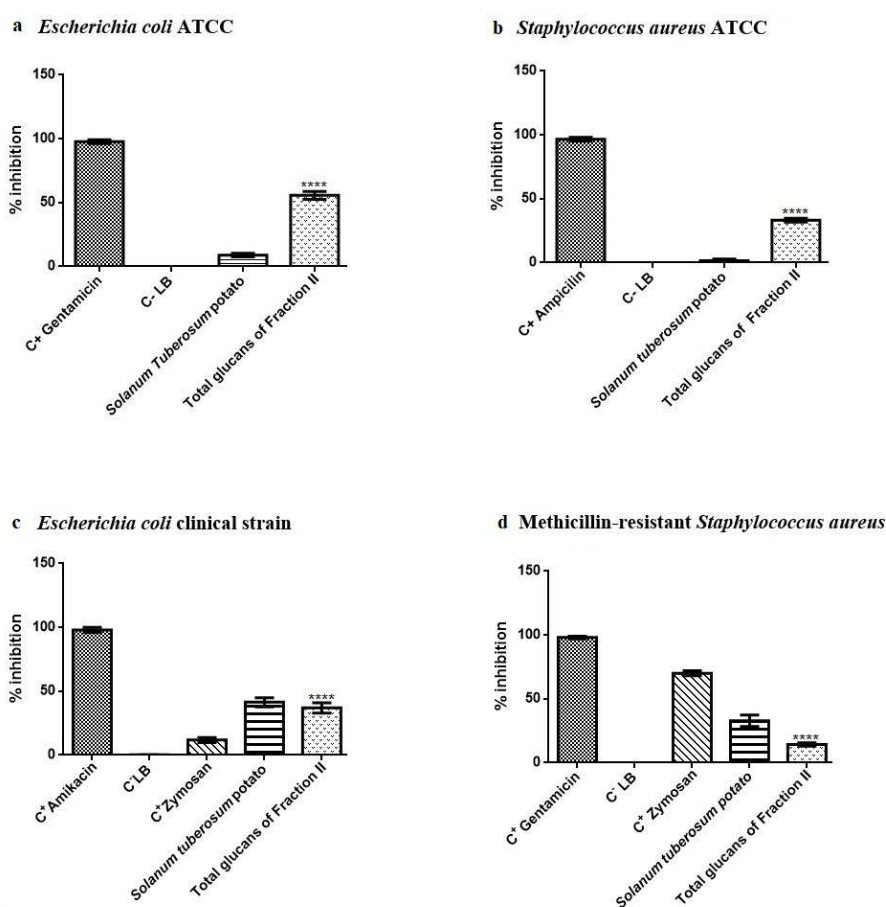
**Figure 3.** <sup>13</sup>C NMR spectrum (150 MHz) in D<sub>2</sub>O. **a:** Results for the total glucans of Fraction II showing spectra characteristic of molecules with  $\alpha$ -glucan (101-102 ppm) and  $\beta$ -glucan glycosidic bonds (102-104 and 90-60 ppm). **b:** Results for the control (potato total glucans) showing spectra characteristic of molecules with  $\alpha$ -glucan and  $\beta$ -glucan glycosidic bonds. Duplicate assay.

In the <sup>1</sup>H NMR spectra, using the total glucans from the Fraction II sample, a signal in the anomeric region of 3.5-4.8 ppm, demonstrated a familial similarity to  $\beta$ -glucans (**Fig. 2a**). Comparison of the <sup>1</sup>H NMR spectra and the evaluation of the molecular structure of  $\beta$ -glucans showed that the maximum percentage of  $\beta$ -glucans in the samples of the total glucans of Fraction II was 89%. Comparison with  $\beta$ -(1-3)-(1-4) or  $\beta$ -(1-3)-(1-6) branched chains gave a probability of 44% for  $\beta$ -(1-3)-(1-4) and 43% for  $\beta$ -(1-3)-(1-6). The <sup>13</sup>C NMR spectra also showed that the total glucans obtained from Fraction II contain  $\alpha$ -glucans (peaks between 102 and 90 ppm, **Fig. 3a**).

Also, it was observed that the  $\alpha$ -glucans present in the total glucans from the Fraction II sample contained  $\alpha$ -(1,3)-(1,4) and  $\alpha$ -(1,3)-(1,6) branched glycosidic bonds. A similar result was found in the sample of the total glucans of the potato *S. tuberosum* (Fig. 2b and Fig. 3b) (Upadhyay, 2017).

#### 4.4 Anti-proliferative assay

The total glucans obtained from Fraction II were evaluated for anti-proliferative bacterial activity, and the results showed 56% inhibition of *E. coli* ATCC (Fig. 4a) and 32% inhibition of *S. aureus* (ATCC) (Fig. 4b).



**Figure 4.** Antibacterial assays using samples of total glucans of Fraction II. **a:** Percentage of growth inhibition for *E. coli* ATCC. **b:** Percentage of growth inhibition for *S. aureus* ATCC. **c:** Percentage of growth inhibition for *E. coli* clinical strain. **d:** Percentage of growth inhibition for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clinical strain. ANOVA: \*\*\*\* indicates  $P < 0.0001$ , i.e., statistically significant inhibition, compared with C-LB and with the control consisting of the total glucans in potato. Triplicate assay.

In the assay against the *E. coli* clinical strain, the total glucans obtained from Fraction II showed inhibition of 37% (**Fig. 4c**). As controls, Zymosan and the total glucans from a potato sample, 50 mg.mL<sup>-1</sup>, were tested and exhibited inhibition of 11% and 41% respectively (**Fig. 4c**). In the bioassay against methicillin-resistant *S. aureus*, the total glucans from Fraction II resulted in 14% inhibition, and the controls, Zymosan and the total glucans from potato sample, 50 mg.mL<sup>-1</sup>, resulted in 70% and 34% inhibition, respectively (**Fig. 4d**).

## 5. Discussion

Since their discovery in approximately 1940,  $\beta$ -glucans have been studied because of their bioactive properties (Vaclav, 2009; Vaclav and Miroslav, 2013). Since then, various extraction and purification protocols have been developed and patented due to the biotechnological potential of these molecules. (McCleary and Glennie-Holmes, 1985; McCleary and Nurthen, 1986; McCleary and Codd, 1991; Dawkins, 1993; Vaclav and Miroslav, 2013). However, this project is one of the first to reuse agro-industrial residue for the extraction of  $\beta$ -glucan molecules with biotechnological potential.

Oliveira et al. (2010) reported a comparative study on the degree of purity produced by three methodologies for the extraction of  $\beta$ -glucans in oats: (i) using 100% ethanol as the main solvent (Dongowski, 2005), the final purity of the  $\beta$ -glucans was 53%; (ii) using NaOH as the solvent (Bathy et al., 1995), the final purity of the  $\beta$ -glucans was 80%; (iii) using water at 90°C (Kucles et al., 1992), the final purity of the  $\beta$ -glucans was 83%. The method developed in this study gave a purity of 94.52% (**Table 1**), showing the success of the extraction protocol described in this work. When using the methodology developed for the extraction of  $\beta$ -glucans from oat (*Avena sativa*) flakes (QUAKER®), we obtained a purity of 70%. Therefore, the developed methodology proved to be efficient, since we obtained a purity 17% higher than that of the methodology described by Dongowski (2005).

Many and Vizhi (2014) compared three different methods to quantify  $\beta$ -glucan molecules from dry *Saccharomyces cerevisiae*: (i) with the enzymatic method, which is a combination of the methods developed by Freimund et al. (2003), Pornchalearn (2006), and Liu et al. (2008), they could obtain 6.43%  $\beta$ -glucans out of all purified carbohydrates; (ii) using the acid-alkaline method, developed by Willians et al. (1991) and improved by Hunter et al. (2004), 3%  $\beta$ -glucans were obtained; (iii) and using the alkaline method



developed by Willians et al. (1991), 1.36%  $\beta$ -glucans were obtained. Lee et al. (2001) used another method involving alkaline extraction to obtain 4%  $\beta$ -glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. This methodology obtained percentages higher than those reported in the literature (**Table 1**).

Ahmad et al. (2010) obtained a yield of 6 g of  $\beta$ -glucans out of 100 g of oats *in natura* using the enzymatic method. Dawkins (1993) obtained 7 g of  $\beta$ -glucans out of 100 g of oats *in natura*. Moreover, when the enzymatic method was used for the extraction and purification of 100 g of barley, 6 g of  $\beta$ -glucans was recovered (Irakli et al., 2004). With the hot water extraction method developed by Ahmad et al. (2009), Many and Vizhi (2014) obtained 5 g of  $\beta$ -glucans from 100 g of barley and, with the method described by Wood, Siddiqui, and Paton (1978) and adapted by Temelli (1997), Limberger-Bayer (2014) obtained 5 g of  $\beta$ -glucans from 100 g of barley. The method developed in this study provided 7 g of  $\beta$ -glucans out of 100 g of Fraction II, showing that Fraction II is a source of  $\beta$ -glucans (**Table 1**).

The comparison was performed using the process developed in oat (*Avena Sativa*) flakes (QUAKER®), and a yield of 8 g of  $\beta$ -glucans was obtained. Therefore, with the developed methodology was obtained, on average, a yield 40% of  $\beta$ -glucans (Ahmad et al., 2010). These results indicated that Fraction II is equivalent to sources already known in the literature, such as oats and barley to obtain  $\beta$ -glucans (Dawkins, 1993; Oliveira et al., 2010; Ahmad et al., 2010) and showed that the developed methodology can be used for the extraction and purification of  $\beta$ -glucans from other products, such as oats (Ahmad et al., 2010).

NMR spectroscopy is an appropriate analytical method for determining the chemical structures of organic or inorganic molecules (Novak et al., 2012; Pavia et al., 2016). This method is sensitive to the position and anomeric configuration of glycoside linkages in  $\beta$ -glucans (Novak et al., 2012; Vaclav and Miroslav, 2013; Pavia, 2016). For the past 50 years, this procedure has been a reliable tool for the structural analysis of organic compounds such as glucans (Ahmad et al., 2009; Novak et al., 2012; Vaclav and Miroslav, 2013; Pavia et al., 2016). The method requires interpreting the spectra originating from different nuclei:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{15}\text{N}$  or  $^{31}\text{P}$  (Ahmad et al., 2010; Pavia et al., 2016). In this study, we chose to analyse the spectra obtained from  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ .

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the total glucans of the Fraction II suggested that  $\beta$ -glucan type polysaccharides were present in the sample (Ahmad et al., 2009; Novak et

al., 2012; Pavia et al., 2016;). Analyses of  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum by ACD/Spectrus revealed a compatibility of 89% between  $\beta$ -glucans and the samples of the total glucans in Fraction II (**Fig. 2a** and **Fig. 3a**) (Gonzaga et al., 2005; Synytsya and, Novak, 2014; Upadhyay et al., 2017). The  $^{13}\text{C}$  NMR spectra showed signals ranging between 102.5 and 102.34 ppm, which can be attributed to  $^1\text{C}$  and are characteristic of branched  $\beta$ -(1,3)-(1,4) and  $\beta$ -(1,3)-(1,6) (Vaclav and Miroslav, 2013; Synytsya and, Novak, 2014; Upadhyay et al., 2017). The presence of at least six signals of similar magnitude between 90-60 ppm supports these results (**Fig. 3a**) (Chauveau et al., 1996; Vaclav and Miroslav, 2013; Synytsya and, Novak, 2014; Upadhyay et al., 2017). These results are consistent with the fact that the Fraction II sample is from a ferment of potato. The signal at 101.39 ppm is indicative of the presence of  $\alpha$ -glucan molecules (Ahmad et al., 2009; Novak et al., 2012). These results confirmed the enzymatic quantification, which shows the presence of a small amount of these molecules in the sample extracted from Fraction II (**Table 1**) (Chauveau et al., 1996; Usui et al., 2014; Vaclav and Miroslav, 2013; Upadhyay et al., 2017).

The total glucans from the potato sample showed signals ranging between 100.47 and 100.25 ppm, which can be attributed to  $^1\text{C}$  and are characteristic of  $\alpha$ -glucans; however, it also showed peaks between 90 and 60 ppm that are characteristic of branched  $\beta$ -(1,3)-(1,4) (**Fig. 3b**) (Gonzaga et al., 2005; Novak et al., 2012; Synytsya and, Novak, 2014; Vaclav and Miroslav, 2013; Upadhyay et al., 2017).

Thus, after the enzymatic quantification and analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, it was found that Fraction II contains  $\beta$ -glucan molecules and therefore could be used as a plausible source for the extraction of  $\beta$ -glucan molecules with biotechnological potential.

The reuse of this residue is consistent with the recommendations of the UN and FAO that encourage the reuse of discarded materials to obtain new value-added products (Gustavsson et al., 2011; Wadhwa et al., 2014). In addition, the extraction and purification of  $\beta$ -glucans from Fraction II can, in the future, serve as a high-quality alternative for the generation of new therapeutically or immunopreventive products for use in human health or as raw material in the food and beverage industries (Vaclav, 2009; Fengmei et al., 2016).

$\beta$ -Glucans act on both adaptive and innate immunity and, as a consequence, can directly activate leukocytes by assisting in the control of some pathogens, such as *Streptococcus suis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus sp.*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei*, *Mesocestoides corti*, *Trypanosoma cruzi*

and *Eimeria vermiformis* (Akramienė, 2007; Novak, 2009; Vaclav, 2011; Ardizzoni et al., 2011;). Min et al. (2005) obtained 50% growth inhibition of *E. coli* ATCC with  $\beta$ -glucans derived from oats, at a concentration of 1.29 mg/mL when they increased the concentration to 2 mg/mL, the inhibition was 80%. *In vivo* and *in vitro* studies demonstrate that  $\beta$ -glucans reduce the risk of infection by *S. aureus* and *E. coli*. They also improve the efficacy of antibiotics, such as ampicillin, when administered against bacterial peritonitis (Onderdonk, 1992; Min et al., 2005; Akramienė, 2007; Vaclav, 2011; Ardizzoni et al., 2011).

An assay using the total glucans of Fraction II against *E. coli* ATCC obtained 56% inhibition (Min et al., 2005). The bioassay against *S. aureus* ATCC obtained inhibition of 33% using the total glucans of Fraction II (**Fig. 4a** and **b**). That is, the total glucans of Fraction II exhibited statistically significant inhibition against the bacteria *E. coli* ATCC and *S. aureus* ATCC (**Fig. 4a** and **b**) (Min et al, 2005; Ardizzoni et al., 2011). This inhibition of both Gram-positive and Gram-negative bacteria is consistent with the references in the literature (Min et al., 2005; Ardizzoni et al., 2011). Some bacteria have a specific cell wall structure that may make them more susceptible to active molecules or drugs, such as  $\beta$ -glucans, and this could be one of the hypotheses for the different levels of inhibition in the assays against *E. coli* ATCC and *S. aureus* ATCC (**Fig. 4a** and **b**) (Min et al., 2005; Ardizzoni et al., 2011).

In the assay against the clinical strain of *E. coli*, an antibacterial activity of 37% (total glucans of Fraction II) was obtained. In addition, in the assay against methicillin-resistant *S. aureus*, the inhibition was 14% (total glucans of Fraction II) (**Fig. 4c** and **d**). These data demonstrated that the molecules extracted and purified (even not purified to 99.99%) by the method developed have antibacterial activity equivalent to those described in the literature (Kernodle, 1998; Liang, 1998; Williams et al., 1998; Ardizzoni et al., 2001; Min et al, 2005). Zymosan (positive control) obtained an inhibition of 70% against the methicillin-resistant *S. aureus* strain and of 11% against the clinical strain of *E. coli* (**Fig. 4c** and **d**), and the total glucans from potato exhibited an inhibition of 41% against the *E. coli* clinical strain and 34% against methicillin-resistant *S. aureus* (**Fig. 4c** and **d**). Antibacterial studies demonstrated that the  $\beta$ -glucans induce different percentages of inhibition (Min et al, 2005; Ardizzoni et al., 2011). These differences can be attributed to the different strains (generic strains, clinical isolates or strains resistant to some drug) or different bacteria (Gram-positive or Gram-negative) used in each assay (Min et al, 2005;

Ardizzoni et al., 2011). The findings of this study and earlier reports of antibacterial activity suggest that  $\beta$ -glucans, depending on the source, type of extraction, molecular structure, level of branching, solubility and physiological activity, have the potential for strong inhibition against some bacteria and insignificant inhibition against others. (Ardizzoni et al., 2011; Vaclav and Miroslav, 2013; Pizarro, 2014).

One of the hypotheses about the difference in antibacterial effect between the clinical strain of *E. coli* (Gram-negative) and methicillin-resistant *S. aureus* (Gram-positive) may be due to the structure of the cell walls (Min et al., 2005; Ardizzoni et al., 2011). Some bacteria have a specific cell wall structure that may make them more susceptible to bioactive molecules or drug attacks (Min et al., 2005; Vaclav and Miroslav, 2013). Thus, another hypothesis is that the molecular structure and branching type of the total glucans of the samples used in this study may have interfered with their antibacterial effect (Min et al., 2005; Vaclav and Miroslav, 2013). However, more studies need to be performed to test these hypotheses.

## 6. Conclusions

The methodology developed in this study showed effective extraction of  $\beta$ -glucans, compared with the methods previously described, with the advantages of using inexpensive solvents, being simple to apply, and having a low cost. The yield and the degree of purity of  $\beta$ -glucans extracted from Fraction II are similar to those obtained from oats, barley, and yeast. Analyses of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were supported by the results obtained from enzymatic quantification, showing a considerable amount of  $\beta$ -glucans. Therefore, the residues of Fraction II proved to be valuable and practical for the extraction and purification of  $\beta$ -glucans. The extracted  $\beta$ -glucans presented relevant biotechnological potential and can be used in the food and cosmetic industries, food supplements, eye drops, and medicines for human health.

## 7. Perspectives

Future research should improve the techniques for the purification of total glucans to separate  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucans and obtain  $\beta$ -glucan molecules with a degree of purity of approximately 99%. Another aim is to perform *in vitro* and *in vivo* studies to confirm the antibacterial and antifungal activity and the immunological and antitumor activity of Fraction II.

## 8. Acknowledgements

This work was supported by ImmunoLife/Carbom Brasil, Embrapa, CAPES and FAPDF.

NM performed all experiments; PB performed methodology of extraction, purification, enzymatic quantification, and anti-proliferative assay. AL performed Nuclear Magnetic Resonance assay. AM contribute to article review. MK designed the study; MF designed the study. All authors read and approved the submission of the manuscript.

The authors do not report any conflict of interest.

## 8. References

1. Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., Ahmed, Z. 2010. Extraction and characterization of  $\beta$ -D-glucan from oat for industrial utilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 304-309. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.01.002.
2. Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., Din, A. 2009. Physicochemical and functional properties of barley  $\beta$ -glucan affected by different extraction procedures. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 81-187. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01721.x.
3. Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., Kevelaitis E. 2007. Effects of Beta-glucan on the immune system. *Medicina, Kaunas*, 43, 597-606. <https://pdfs.semanticscholar.org/b4b6/b6a13654d6460c95044c48b5dbcd062eb217.pdf>. (accessed 30.08.17).
4. Ardizzoni, A., Neglia, R. G., Baschieri, M. C., Cermelli, C., Caratozzolo, M., Righi, E., Palmieri, B., Blasi, E. 2011. Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens. *Journal of Materials Science*, 22, 2329–2338. DOI: 10.1007/s10856-011-4408-2.
5. Aziabile, E., Tchegueni, S., Bodjona, M. B., Degbe, A. K., Zamama, Hafidi, M., El Meray, M., Kili, K. A. 2017. Valorization of agro-industrial waste by bioprocess aerobic “composting”. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8, 1277-1283. <http://www.jmaterenvironsci.com> (accessed 25.08.17).

6. C.L.S.I, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: *Twenty-second information supplement*, USA, 32, 188-189. ISBN 1-56238-804-5. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/> (accessed 20/03/2016)
7. Chauveau, C., Talaga, P., Wieruszeski, J. M., Strecker, G., Chavan, L. 1996. A water-soluble  $\beta$ -D-glucan from *Boletus erythropus*. *Phytochemistry*, 43, 413-415. DOI:10.1016/0031-9422(96)00234-8.
8. Dawkins, N. L., Nnanna, I. A.. 1993. Oat gum and  $\beta$ -glucan extraction from oat bran and rolled oats: temperature and pH effects. *Journal of Food Science*, 58, 562-566. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb04324.x.
9. Dongowski, G. D. 2005. Rheological behaviour of  $\beta$ -glucans preparations from oat products. *Food Chemists*, 93, 279-291. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.051.
10. Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Otterdijk, R. V., Meybeck, A. 2011. Global food losses and food waste: Extent, causes and prevention. <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf> (accessed 07.05.17).
11. Fengmei, Z., Bin, D., Baojun, X. 2016. A critical review on production and industrial applications of  $\beta$ -glucans. *Food Hydrocolloids*, 52, 275-288. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.07.003.
12. Fernandes, F., Pereira, A., Germani, J., Oiano-Neto, J. R. 2008. Effect of partial replacement of wheat flour by potato peel flour (*Solanum Tuberosum*). *Food Science and Technology*, 28, 56-65. DOI: 10.1590/S0101-20612008000500010.
13. Gonzaga, M. L., Ricardo, N. M., Heatley, F., Soares, S. D. 2005. Isolation and characterization of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 60, 43-49. DOI:10.1016/j.carbpol.2004.11.022
14. Gudiña, E.J., Rodrigues, A.I., de Freitas, V., Azevedo, Z., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. 2016. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids, *Bioresource Technology*, 2-32. DOI:10.1016/j.biortech.2016.04.027
15. Irakli, M., Biliaderis, C. G., Izydorczyk, M. S., Papadoyannis, I. N. 2004. Isolation, structural features and rheological properties of water-extractable  $\beta$ -glucans from different Greek barley cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1170-1178. DOI:10.1002/jsfa.1787.

16. Kernodle, D. S. 1998. Prophylactic Anti-Infective Activity of Poly-[1-6]- $\beta$ -D-Glucopyranosyl [1-3]- $\beta$ -D-Glucopyranose Glucan in a *Guinea Pig* Model of *Staphylococcal* Wound Infection. *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 545–549. <http://aac.asm.org/content/42/3/545.long> (accessed 10/05/2016).
17. Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystroem, M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations, *Bioresource Technology*, 87, 167–198. DOI:10.1016/S0960-8524(02)00167-0.
18. Lee, J., Lee D., Ji I., Kim, G., Hye, N., Sohn, J., Kim, C. 2001. Purification of soluble Beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Japan Society for Bioscience and Agrochemical*, 65, 837-41. DOI:10.1271/bbb.65.837.
19. Liang, J, M. D. 1998. Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *International Journal of Immunopharmacology*, 20, 595-614. DOI:10.1016/S0192-0561(98)00007-1.
20. Lima, L. A., Mogliolo, L., Castro, C. B., Pires, D. O., Lopez-Abarratequi, C., Goncalves, E. F., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., Otero-Gonzalez, A. J., Franco, O. L. 2013. Identification of a novel antimicrobial peptide from Brazilian coast coral *Phyllogorgia dilatata*. *Protein & Peptide Letters*, 20, 1153–1158. DOI:10.2174/0929866511320100010
21. Limberger-Bayer, V. M., Francisco, A., Chan, A., Oro, T., Ogliari, P. J., Barreto, P. L.M. 2014. Barley b-glucans extraction and partial characterization, *Food Chemistry*, 154, 84-89. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.12.104.
22. Many, J. N., Vizhi, K. 2014. Analysis of Different Extraction Methods on the Yield and Recovery of  $\beta$ -Glucan from Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 1, 1-6. [http://ijiset.com/v1s6/IJISSET\\_V1\\_I6\\_44.pdf](http://ijiset.com/v1s6/IJISSET_V1_I6_44.pdf) (accessed 15/06/2016).
23. McCleary, B. V., Glennie H. M. 1985. Enzymic Quantification of (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glucan in Barley and Malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 91, 285-295. DOI:10.1002/j.2050-0416.1985.tb04345.x.

24. McCleary, B., Codd, R. 1991. Measurement of (1→3)-(1→4)-β-D-Glucan in Barley and Oats: A Streamlined Enzymic Procedure. *Journal of Food Science and Agriculture*, 55, 303-312. DOI:10.1002/jsfa.2740550215.
25. McCleary, B., Nurthen, E. 1986. Measurement of (1→3) (1→4)-β-D-Glucan in Malt, Wort and Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 92, 168-173. DOI:10.1002/j.2050-0416.1986.tb04392.x.
26. Megazyme International Ireland. 2014. Total Dietary Fiber, Assay Procedure. [https://secure.megazyme.com/booklet/k-tdfr\\_data.pdf](https://secure.megazyme.com/booklet/k-tdfr_data.pdf) (accessed 23.08.17).
27. Min, S. S., Suyong, L., Kwang, Y. L., Hyeon, G. L. 2005. Structural and Biological Characterization of Aminated-Derivatized Oat,-Glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5554–5558. DOI:10.1021/jf050273j.
28. Maxwell, S. E., Delaney, H. D., Kelley, K. 2007. Designing Experiments and Analyzing Data: A Model Comparison Perspective, Third ed. Lawrence Erlbaum Associates, Publishers, New Jersey, EUA. ISBN:0-8058-3718-3.
29. Novak, M., Synytsya, A., Gedeon, O., Procházka, V., Synytsyad, A., Blahovec, J., Hejlová, A., Čopíková, J. 2012. Yeast β-(1,3), (1,6)-D-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2496-2504. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.11.031.
30. Novak, M. V. 2009. Glucans as biological response modifiers. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders and Drug Targets*, 9, 67-75. DOI:10.2174/187153009787582423
31. Oliveira, L. D., Durigon, A., Mazzutti, S., Borges, C. D., Elias, M. C., Gutkoski, L. C. 2010. Comparative study between methods of extraction of β-glucans in white oat grains. *Food and Nutrition*, 21, 183-189. [bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/1410/926](http://bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/1410/926) (accessed 05/08/2016). In portuguese.
32. Onderdonk, A. B. 1992. Anti-Infective Effect of Poly-13-6-Glucotriosyl-13-3-Glucopyranose Glucan *In Vivo*. *Infection and Immunity*, 60, 1642-1647 <http://iai.asm.org/content/60/4/1642.short> (accessed 24/06/2016).
33. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. R. 2016. Introduction to Spectroscopy, fifth ed. Cengage. Independence, Kentucky. ISBN: 978-85-221-2338-4.



34. Pizarro, R. S. 2014.  $\beta$ -glucans: what types exist and what are their health benefits? *Chilean Nutrition Magazine*, 41, 439-445. DOI:10.1155/2012/851362.
35. Sanseverino, A. M. 2000. Clean organic synthesis. *New Chemistry*, 23, 102-107. DOI: 10.1590/S0100-40422000000100018.
36. Synytsya, A, Novak, M. (2014). Role of (1,3)(1,4)- $\beta$ -Glucan in Cell Walls: Interaction with Cellulose, *Annals of Translational Medicine*, 2, 1-14. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07
37. Usui, T., Yamaoka, N., Matsuda, K., Tuzimura, K., Sugiyama, H., Seto, S. 2014.  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance for Structural Investigation of Some Glucans. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39, 1071-1076. DOI:10.1080/00021369.1975.10861726.
38. Vaclav, V., Miroslav, N. 2013. Biology and Chemistry of Beta Glucan: Beta-Glucan, Structure, Chemistry and Specific Application. Canada: *Bentham Science Publishers*, 1-258. DOI:10.2174/97816080526081130201.
39. Upadhyay, T. K., Fatima, N., Sharma, D., Saravanakumar, V., Sharma, R. 2017. Preparation and characterization of beta-glucan particles containing a payload of nanoembedded rifabutin for enhanced targeted delivery to macrophages. *Experimental and Clinical Sciences International online journal for advances in science* 16, 210-228. DOI:10.17179/excli2016-804
40. Vaclav, V. 2011. Glucan immunostimulant adjuvant potential drug. *The World Journal of Clinical Oncology*, 10, 115-119. DOI:10.5306/wjco.v2.i2.115.
41. Vaclav, V. 2009. Beta glucan: Nature's Secret. Kindle Book, Louisville, Kentucky.
42. Wadhwa, M., Bakshi, M. P. S. 2014. Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. <http://www.fao.org/docrep/018/i3273e/i3273e.pdf> (accessed 07/10/17).
43. Whitehead, A. 2014. Cholesterol-lowering effects of oat  $\beta$ -glucan: a meta-analysis of. *Clinic American Journal of Clinical Nutrition*, 100, 413-21. DOI:10.3945/ajcn.114.086108.
44. Williams, D., Sherwood, E., Browder, I., Mcnamee, R., Jones, E., Rakinic, J., Di Luzio, N. 1988. Effect of glucan on neutrophil dynamics and immune function in *Escherichia coli* peritonitis. *Journal of Surgical Research*, 44, 54-61. DOI:10.1016/0022-4804(88)90122-9.

45. Young-Teck, K., Eun-Hee, K., Chaejoon, C., David, L. W., Chan-Wha, K., Seung-Taik, L. 2000. Structural characterization of  $\beta$ -D-(1-3, 1-6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 328, 331–341. DOI:10.1016/S0008-6215(00)00105-1.

## 8.0 CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida neste estudo se mostrou efetiva na extração e purificação de  $\beta$ -glucanas, em comparação com os métodos previamente descritos, com as vantagens de usar solventes baratos, sendo simples de aplicar e de baixo custo.

O rendimento e o grau de pureza das  $\beta$ -glucanas extraídos da Fração II são semelhantes ou, em alguns casos, superiores aos obtidos com aveia, cevada e levedura.

As análises dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN e de  $^{13}\text{C}$  RMN foram suportadas pelos resultados obtidos por quantificação enzimática, mostrando uma quantidade considerável de  $\beta$ -glucanas. Portanto, a Fração II provou ser valiosa para a extração e purificação destas macromoléculas.

As  $\beta$ -glucanas extraídos apresentaram potencial biotecnológico relevante ( $p < 0.0005$ ) podendo, futuramente, serem utilizadas nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas, colírios ou como suplemento alimentar para auxiliar na manutenção da saúde humana.

Em resumo, o presente trabalho concluiu que a metodologia desenvolvida para a extração e purificação (utilizada no reaproveitamento do resíduo “Fração II”) resultou no isolamento de  $\beta$ -glucanas biologicamente ativas, com potencial aplicação em diversas áreas tais como alimentícia, farmacêutica e agropecuária, resultando em futuras parcerias público-privada.

## 9.0 PERSPECTIVAS

- Fazer ensaios in vivo para confirmar a atividade reguladora do sistema imunológico
  
- Realizar alguns ensaios na área de Tecnologia de Alimentos
  
- Contribuir com o reaproveitamento de lixo orgânico para produção de novo produto com potencial biotecnológico e assim contribuir com a parceria entre o setor produtivo e o setor privado

## 10. ANEXOS

### 10.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Eu, Leandro Gai Anversa, CPF 740.390.400-15, RG 9054088712 – SSP-RS, proprietário e Representante Legal da *ImmunoLife*, CNPJ 16.756.915;00001-51, tenho conhecimento e autorizo a Mestranda Nevilde Maria Riselo Sales, matrícula número 150155069 do curso de Mestrado em Nutrição Humana da Universidade de Brasília (UnB-DF), sob a orientação da Professora Dra. Maria Fátima Grossi-de-Sá (EMBRAPA/Cenargen-DF) e coorientada pela Professora Dra. Marina Kiyomi Ito (Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana-UnB/DF), usar o coproduto orgânico derivado da produção de fertilizante foliar orgânico (Patente número PI 1003290-8, depositada em 23/07/2010, sob o título: Produtos obtidos a partir de um derivado de fermentação alcoólica da batata e processo para obtenção dos mesmos), produzido pela empresa, em sua pesquisa de mestrado intitulado “Obtenção de  $\beta$ -glucana a partir de batata *Solanum tuberosum* com potencial biotecnológico” e cujo objetivo geral é: Extrair e purificar as moléculas de  $\beta$ -glucana com potencial biotecnológico.

A presente pesquisa não gerará custos de quaisquer ordens para a Empresa *ImmunoLife*, não irá interferir na operacionalização e/ou nas atividades cotidianas da mesma. O material doado (coproduto orgânico) será utilizado exclusivamente para fins científicos pelas Instituições de Ciência e Tecnologia e pelas equipes de pesquisadores participantes do projeto, não vinculados a Empresa *ImmunoLife*.

Da mesma forma, a doação do composto orgânico, para a pesquisa, será feita de forma voluntária e gratuita, por parte da Empresa *ImmunoLife* às pesquisadoras, não gerando ônus algum a mestranda ou a suas orientadoras.

Informo, ainda, que recebi todos os esclarecimentos necessários sobre a pesquisa que será desenvolvida pela mestranda e que os resultados da mesma serão divulgados na UnB por meio da Dissertação de Mestrado e em artigos científicos publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados (composto orgânico) na pesquisa ficarão



sob a proteção da mestrandia por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição.

As invenções de utilidades desenvolvidas durante o trabalho de mestrado pertencerão a *ImmunoLife* e as Instituições de Ciências e Tecnologia envolvidas e a equipe de pesquisadores participantes do respectivo projeto.

A divisão da porcentagem (direitos sobre os lucros/dividendos oriundos da patente) sobre a invenção será feita da seguinte forma: 80% (oitenta por cento) ficará com a Empresa *ImmunoLife* e 20% (vinte por cento) será dividido entre as Instituições de Ciências e Tecnologia envolvidas (EMBRAPA/Cenargen-DF; UnB-DF).

Brasília, 14 de Novembro de 2016

1º TN - Reconheço

Representante Legal da empresa ImmunoLife Ltda  
Leandro Gai Anversa

Maria Fátima Grossi de Sá  
Assina

Assina  
4º OFÍCIO DE NOTAS DO DF

Orientadora  
Professora Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Assina

Coordenadora  
Professora Dra. Marina Kiyomi Ito

Assina  
4º OFÍCIO DE NOTAS DO DF

**4º OFÍCIO DE NOTAS - DF**  
 RUA DO SAU ED. MARANHÃ, CLÁ. 108/114 - BRASÍLIA, DF  
 E-MAIL: (61) 3238-5239/5015-2350/3702-7474  
 4oficiodenotas@imnotas.com.br  
 RECONHEÇO e dou fé por SEMELHANÇA a(e) firma(s) de  
 130989951 - MARIA FÁTIMA GROSSI DE SÁ  
 101229151 - MARINA KIYOMI ITO  
 São TUDFT20170090750844GEBX e TUDFT20170090750844SIEM  
 BSB 03/07/2017 - 18:20:38 - Consultar em: www.fictfl.jus.br  
 MACN-Tabella: Evildo Feijosa dos Santos  
 AROLD DE SOUZA ARNOLD  
 QUALQUER CANCELAMENTO OU RESCISÃO INVÁLIDA O DOCUMENTO

Alcides Leite de Moura  
4º Ofício de Notas do DF  
Autorizado

**1º Tabelionato de Notas e Registro de Imóveis de Formosa**  
 Rua Anhangueira 125, Centro, Formosa GO, 61-3632-1088 e 1086 atendimento@cartoriodeformosa.com.br  
**RECONHECIMENTO**  
 Reconheço, por SEMELHANÇA, a assinatura de LEANDRO GAI ANVERSA  
 Dou Fé, Formosa GO, 18 de novembro de 2016.  
 Solo digital: 016436062115560946-07434  
 Valdivson de Jesus Marques  
 Escrevente

