



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102012030910-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102012030910-6

(22) Data do Depósito: 04/12/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 09/09/2014

(51) Classificação Internacional: A61K 36/48; A61P 1/00; A61P 31/04; A23K 10/30.

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM INIBIDOR DA ADESÃO BACTERIANA OBTIDO A PARTIR DE FARELO DE SOJA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua XV de Novembro, 695, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80020-310

(72) Inventor: MIGUEL DANIEL NOSEDA; CARLOS RICARDO SOCCOL; JENIFER MOTA RODRIGUES; MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 04/12/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 24/08/2021

Assinado digitalmente por:

Adriana Briggs de Aguiar

Diretora Substituta de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

15 de Novembro
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
de 1889

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM INIBIDOR DA ADESÃO BACTERIANA OBTIDO A PARTIR DE FARELO DE SOJA

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção refere-se a um bioproduto inibidor de adesão bacteriana, obtido a partir de farelo de soja, contendo altos teores de proteínas e carboidratos, capaz de adsorver enterobactérias, prevenindo infecções gastrointestinais em animais. Especificamente, trata sobre composições para tratar e prevenir infecções causadas por bactérias gram-negativas. Mais especificamente, trata sobre o processo de fabricação do referido material inibidor de adesão bacteriana utilizado nas referidas composições.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

Farelo de soja

[2] O Brasil é mundialmente o segundo maior produtor de soja com uma produção de 74 milhões de toneladas na safra 2011 (USDA, 2011; EMBRAPA, 2011a; IBGE, 2012). Os maiores estados produtores são Mato Grosso e Paraná com produções, em 2010, de 20,4 e 15,4 milhões de toneladas, respectivamente (EMBRAPA, 2011b).

[3] A soja é um grão altamente versátil originando produtos e subprodutos utilizados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Sua aplicação mais conhecida é a obtenção de óleo, processo este, mecânico e/ou químico, gerador de grandes quantidades de um subproduto denominado farelo de soja.

[4] O farelo de soja é um produto relativamente barato com grande potencial de uso como suplemento, fonte de nitrogênio, proteína, polissacarídeos ou substrato em processos biotecnológicos. O farelo representa em torno de 70% da semente de soja. Sua composição pode variar sendo aproximadamente 50% proteínas, 40% de carboidratos e 10% de cinzas e outros componentes (BAINY *et al.*, 2008).

[5] A fração de carboidratos inclui açúcares simples (monossacarídeos e dissacarídeos), oligossacarídeos e polissacarídeos (celulose, hemiceluloses, pectina e amido) (LIU, 1999). Seu elevado teor em proteínas faz do farelo de soja a principal matéria prima na fabricação de rações para alimentação de animais. Quase 70% do farelo proteico das rações que alimentam os animais domésticos vêm da soja (EMBRAPA, 2011c). Embora grande parte deste resíduo seja destinada a rações animais, diversas pesquisas e processos têm sido desenvolvidos com o intuito de obter produtos refinados, com um maior valor agregado (STRÖHER, 2010).

[6] Carboidratos de soja são o segundo maior componente depois das proteínas indicando um importante valor econômico para a indústria de soja (BAINY *et al.*, 2008). Segundo Aspinall (1988) os polissacarídeos da soja podem ser separados em uma fração principal não-celulósica e uma fração menor celulósica, sendo a fração não-celulósica constituída de polissacarídeos ácidos e arabinogalactanas. Segundo Aspinall *et al.* (1967a), o principal açúcar ácido presente na soja é o ácido galacturônico. Esses polissacarídeos ácidos possuem então ácido D-galacturônico e L-ramnose na cadeia principal com cadeias laterais constituídas principalmente de unidades de galactose e arabinose (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998; FURUTA *et al.*, 1998).

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

[8] Dentre os polissacarídeos obtidos da soja, as arabinogalactanas têm sido estudadas intensamente (ASPINALL *et al.*, 1967a; ASPINALL *et al.*, 1967b; MORITA, 1965; LABAVITCH; FREEMAN; ALBERSHEIM, 1976) e mostrado conter cadeias principais de β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4)-

ligadas, onde algumas unidades carregam em C-3 uma cadeia lateral de L-arabinofuranose-(1→5)-ligadas. No entanto, uma grande variação está presente no grau de ramificação e na distribuição dos substituintes na cadeia (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998). Aspinall e Cottrell (1971) isolaram uma arabinana altamente ramificada, contendo arabinofuranose (1→3) e (1→5)-ligada.

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

[10] Fransen *et al.* (2000) isolaram arabinogalactanas de farelo de soja com cadeias laterais substituídas em O-4 por unidades de ramnose. Sua estrutura é formada por uma cadeia principal de galactana β -(1→4)-ligada altamente ramificada com cadeias de arabinana.

[11] Nakamura *et al.* (2001) isolaram a partir de cotilédones de soja deslipidificados e desproteinizados um polissacarídeo denominado pelos autores de Polissacarídeo Solúvel da Soja (SSPS). A estrutura detalhada do SSPS foi determinada por degradação enzimática. As moléculas são polissacarídeos ácidos contendo 18% de ácido galacturônico (NAKAMURA *et al.*, 2002b). A cadeia principal consiste em galacturonana (GN) e ramnogalacturonana (RG). As cadeias laterais de (1→4)- β -galactanas, são ramificadas com resíduos de fucose e arabinose; e as cadeias laterais de (1→3) e (1→5)- α -arabinanas, estão ligadas ao C-4 dos resíduos de ramnose nas regiões RG. Alguns ácidos galacturônicos são modificados em C-3 por oligossacarídeos xilosil, que são compostos de xilose β -(1→4)- e β -(1→2)-ligada (NAKAMURA *et al.*, 2002a).

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

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

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

[15] Cipriani *et al.* (2009) isolaram a partir de farelo de soja uma arabinogalactana do tipo I. Sua cadeia principal é composta de β -D-galactopiranosose-(1→4)-ligada, substituída em O-3 por unidades α -L-arabinofuranose, que por sua vez, são substituídas em O-5, O-3,5 e O-2,5. Esta estrutura está provavelmente ligada em O-4 de algumas unidades ramnosil de ramnogalacturonanas tipo I, formadas pela repetição de grupos (→4)- α -D-ácido galacturônico-(1→2)- α -L-ramnopiranosose-(1→).

Potencial biológico de polissacarídeos de soja

[16] Koga e Kikuchi (1993) isolaram do farelo de soja uma fração de polissacarídeos capaz de aumentar a glicólise, produção de interleucinas 1 pelos macrófagos e a proliferação de esplenócitos. Liao *et al.* (2001) isolaram polissacarídeos de soja preta, com características de (1→6)- α -D-glucana, capazes de estimular macrófagos e linfócitos T, sugerindo então que estes polissacarídeos podem inibir a proliferação de células leucêmicas U397, resultando em resposta biológica modificadora e efeito imunopotencializador. Em estudos posteriores, Liao, Chen e Yang (2005) concluíram que além das atividades já descritas, os polissacarídeos extraídos da soja preta, além de restaurar a contagem de leucócitos também

reforçavam a formação de células da medula óssea.

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

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

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

[20] Tsai *et al.* (1983) testaram os efeitos da ingestão de polissacarídeos de soja nas funções gastrointestinais, balanço nutricional, excreção de esteroides, tolerância a glucose, níveis de lipídeos séricos e parâmetros do sangue em humanos. Após os 17 dias de suplementação com os polissacarídeos de soja, não houve mudanças significativas nos parâmetros de sangue e níveis de lipídeos séricos, no entanto os estudos revelaram um significativo aumento do peso do conteúdo fecal e seu teor de água, e mostraram ainda um potencial capacidade hipoglicemiante. Takahashi *et al.* (1999) em seu trabalho demonstraram que polissacarídeos de soja solúveis em água possuem a capacidade de reduzir o tempo de trânsito gastrointestinal devido a elevada presença de fibras em sua composição.

[21] O documento de invenção US 2005/0107452 refere-se a uma composição nutracêutica, contendo até 99% de polissacarídeos de soja, capaz de aumentar a contagens de células sanguíneas. Estes polissacarídeos

são formados por uma cadeia principal de glucose α -(1→6)-ligada e um ou mais resíduos de manose, galactose e glucose, sendo obtidos a partir de uma extração em solventes orgânicos seguida de precipitação de proteínas com sulfato de cálcio (WANG, S. Y. *et. al.* Black soybean polysaccharides. US 2005/0107452, Dec. 27, 2004).

[22] O documento de patente CN 101537023 relata a administração de polissacarídeos de soja em conjunto com outras substâncias para tratamento e controle de hiperplasia, difusão e metástase de células cancerígenas (PENG, Y. Medicine for treating cancer. CN 101537023 (A), Set. 23, 2009).

[23] Propriedades antiadesão da soja vêm sendo estudadas. Neeser, Koellreutter e Wuersch (1986) testaram oligo-, polissacarídeos e glicopeptídeos, de soja, contendo manose quanto ao potencial inibitório de aderência bacteriana mediada por fímbrias tipo 1 de *E. coli*. Resultados demonstraram que pequenos glicopeptídeos contendo altos conteúdos de manose foram capazes de inibir hemaglutinação em eritrócitos de porcos e a adesão bacteriana em células bucais humanas. Kiers *et al.* (2002) investigaram os efeitos inibitórios do *tempeh* sobre *Escherichia coli* (ETEC) K88. *Tempeh* é um alimento fermentado feito a partir de grãos de soja cozidos inoculados com fungo, normalmente do gênero *Rhizopus*. Extratos de *tempeh* e extratos de grãos de soja cozido inibiram *in vitro* hemaglutinação em eritrócitos de hamster induzidas pela bactéria *Escherichia coli* (ETEC) K88. Esta atividade é dada como resultado à presença de componentes que agregam e/ou adesinas análogas e/ou receptores análogos. Becker *et al.* (2007) e Becker e Galletti (2008) investigaram o *tempeh* e sua capacidade de ligação *in vitro* à diferentes espécies de bactérias (*Salmonella sp.*, *E. coli*, *Lactobacillus spp.*). Bons resultados de capacidade de ligação do *tempeh* foram identificados para as espécies *E. coli* K88, *E. coli* ATCC 25922 e *S. enterica* CIDC 510.

Extração de polissacarídeos

[24] Vários artigos demonstram a extração de polissacarídeos de soja. Alguns reportam a extração de polissacarídeos neutros com agentes

quelantes (90°C, oxalato de amônio e NaOH 0,5%) (KAWAMURA; NARASAKI, 1961), extração alcalina à quente (NaOH 0,1N) (MORITA, 1965), extração alcalina à quente sob pressão (NaOH 0,5%, 120°C, 1 h) (LABAVITCH; FREEMAN; ALBERSHEIM, 1976) ou ainda extração ácida à quente (pH 2–6, 40–120°C, 0,5–6 h) (FURUTA *et al.*, 1998). Em comum todos sugerem que os polissacarídeos de soja são compostos de arabinose, galactose e ácido galacturônico. A presença desses monossacarídeos indica uma considerável quantidade de pectinas (HUISMAN; SCHOLS; VORAGEN, 1998).

[25] Abaixo apresentamos a descrição de documentos de patentes relacionadas à extração de polissacarídeos de soja, porém estes não coincidem com nossa proposta e, portanto, não afetam a originalidade da criação.

[26] JP03-067595 relata a extração de polissacarídeos a partir de fibras insolúveis de soja. Para tanto as fibras sofrem processo de atomização através da aplicação de uma tensão de cisalhamento em meio aquoso, seguido de hidrólise das fibras e proteínas e posterior fracionamento (YUICHI, M. *et al.* Production of water-soluble polysaccharide. JP03-067595, Mar. 22, 1991).

[27] JP11-279203 trata de um método de extração de polissacarídeos solúveis de soja obtidos a partir de extração de soja bruta ou material já processado, com propriedades geleificantes e estabilizantes. O material sofre primeiramente uma etapa extração em pH 1–4 (ácido clorídrico, ácido oxálico, ácido fosfórico), 30–80°C, 2–6 h. Após o material sofre centrifugação e purificação (precipitação com álcool, osmose reversa, ultrafiltração, gel filtração e diálise usando um solvente polar) (HITOSHI, F. *et al.* Water soluble soybean polysaccharide, and its production and use thereof. JP11-279203, Oct. 12, 1999).

[28] JP10-036405 patenteia o processo de extração de polissacarídeos solúveis em água a partir de legumes. O método consiste em extração com ácido clorídrico, pH 4,5, 120°C por 1,5 h. Após centrifugação, o sobrenadante obtido tem seu pH ajustado para 7,0 e protease é adicionada (40°C, 2 h). Ao fim da reação enzimática o material é purificado em coluna

de carvão ativado. O produto obtido tem baixa propriedade de formação de espuma e é capaz de formar uma solução aquosa de alta transparência (HITOSHI, F. *et. al.* Production of water-soluble polysaccharide. JP10-036405, Feb. 02, 1998).

[29] JP10-036404 relata a obtenção de polissacarídeos ricos em ácidos urônicos oriundos de casca de soja. O método de extração consiste em uma solução aquosa, contendo casca de soja, pH ajustado para 3–6 com ácido clorídrico e ácido cítrico, subsequente aquecimento sob pressão (70–130°C, 10 atm, 0,5–5 h), seguida de filtração, neutralização e precipitação com solvente orgânico (KENJI, N.; SHIN, S. Manufacture of polysaccharide containing uronic acid. JP10-036404, Feb. 10, 1998).

[30] JP06-256402 trata de uma extração de polissacarídeos solúveis em água, com propriedades espessante, geleificante e hipocolesterolemiantes. A extração é realizada com resíduos obtidos a partir da extração de proteínas e óleo de grãos, utilizando ácido hexametáfosfórico como agente extrator, pH entre 3–7 e temperatura de 80°C (FUMIHIDE, Y. *et al.* Production of water-soluble polysaccharide. JP06-256402, Set. 13, 1994).

[31] JP07-188301 evidencia um método de extração de polissacarídeos de soja adequado para formulação de bebidas. A extração dos polissacarídeos é realizada a quente, em solução aquosa, pH 6–9 com adição de um agente redutor (hiposulfito de sódio ou potássio, bissulfito de sódio ou potássio) ou oxidante (hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, hidroxihipoclorito de cálcio e peróxido de hidrogênio), seguida do uso de uma protease (pepsina, papaína, subtilisina, bromelina). Agente flocculante de alto peso molecular pode ser adicionado ao sistema a fim de separar e remover o precipitado. Os polissacarídeos obtidos apresentam boa turbidez e baixa taxa de deterioração temporal (HITOSHI, F. *et. al.* Production of water soluble polysaccharide. JP07-188301, Jul. 25, 1995).

[32] WO2007139057 relata a obtenção de polissacarídeos solúveis de soja com capacidades de estabilizar dispersões de bebidas lácteas. Os polissacarídeos são obtidos a partir de *okara* na presença de agente sequestrante em condições neutras e pressão elevada (NANAE, F.; JUNKO, T.;

AKIHIRO, N. Novel water-soluble polysaccharides having high stability and method of producing the same. WO2007139057 (A1), Dec. 06, 2007). Semelhantemente o documento WO2008149738 patenteia um polissacarídeo de soja solúvel em água, que sofreu processo de *cross-linking*, capaz de estabilizar as proteínas próximas do seu ponto isoelétrico (NANAE, F. *et. al.* Method for producing of water-soluble polysaccharide. WO2008149738 (A1), Dec. 11, 2008).

[33] US4,119,435 evidencia polissacarídeos de soja produzidos a partir da extração alcalina ($\text{pH} > 11$), temperatura ente 40–60°C contendo ou não um solvente orgânico. O extrato final obtido contém no máximo 13% de proteínas. A presente invenção não exige tecnologia avançada, é de baixo custo e faz uso de solventes orgânicos para evitar a absorção de água pelo grão, reduzindo a quantidade de água necessária utilizada no processo (NAKAO, Y. *et. al.* Processo for preparing soybean polysaccharides. US4,119,435, Oct. 10, 1978).

[34] PI9600244-1 relata o processo para produção de extrato aquoso de soja destinado à elaboração de produtos alimentares, envolvendo as etapas de seleção de grão, preparo da farinha e extração alcalina (hidróxido de sódio, $\text{pH} > 10,7$), lavagem com água e secagem (JATOBÁ, S. S. Processo para a produção de extrato aquoso de soja. PI9600244-1 (A), Jan. 29, 1996).

[35] CN102232500 refere-se a um método de extração de polissacarídeos solúveis de soja a partir de soja em pó. As etapas envolvidas neste processo consistem de: eliminação de proteínas em meio alcalino; hidrólise enzimática; inativação da enzima (100°C, 10 min), filtração, precipitação com etanol (4x, 12 h), evaporação e concentração, centrifugação (5000 rpm, 15 min) e liofilização (YAO, L.; ZHENYU, W.; HUA, Z. One kind withdraws the soluble soybean polysaccharide from the big bean cake the method. CN102232500, Nov. 09, 2011).

[36] CN1827651 trata de um método de preparação de polissacarídeos solúveis de soja a partir de resíduos de soja. O método envolve extrações alcalinas sequenciais com taxa de recuperação de 7%. A invenção

não exige grandes tecnologias, apresenta uma taxa de rendimento razoável e faz pouco uso de energia (MA, F. Q. Process for preparing water soluble soybean polysaccharide with bean pulp and bean dreg as raw materials. CN1827651 (A), Set. 06, 2006).

[37] WO2010044255 relata a produção de um novo estabilizante de dispersão a partir de grão de soja. O estabilizante consiste em polissacarídeos fosforilados solúveis em água, tendo constituinte principal um açúcar ácido e um íon metal bivalente, capaz de estabilizar proteínas do leite em pH próximo ao ponto isoelétrico (NANAE, F.; AKIHIRO, N.; RYUJI, Y. Process for producing phosphorilated water-soluble polysaccharide. WO2010044255 (A1), Apr. 22, 2010).

[38] CN 1970578 refere-se à obtenção de polissacarídeos solúveis de soja, utilizando solução de hexametáfosfato 1–3%, por 1–50 min, em micro-ondas, seguida de precipitação com etanol e lavagens com acetona (YIN, G. W. Microwave method for extracting water-soluble soybean polysaccharide from bean dregs. CN1970578 (A), May 30, 2007).

[39] CN101619095 trata da preparação de polissacarídeos e proteínas de soja a partir de resíduos de soja. Esta preparação compreende as seguintes etapas: extração em água quente; hidrólise com celulase; concentração, secagem e acondicionamento. Esta invenção utiliza efetivamente resíduos de soja promovendo agregação de valor (LI, X. Preparation method of soybean polysaccharide protein in soybean dregs. CN101619095 (A), Jan. 06, 2010).

[40] CN101671400 relata um método de preparo de polissacarídeos solúveis de soja a partir de hidrólise enzimática, extração com ácido fraco a altas temperaturas, centrifugação, precipitação, filtração e secagem. A invenção tem a vantagem de melhorar o rendimento da extração, diminuir os custos de produção, reduzir a poluição do meio ambiente e é de fácil reprodutibilidade industrial (TU, Z. *et. al.* Method of preparing soluble soybean polysaccharide. CN101671400 (A), Mar. 17, 2010).

[41] CN101880336 relata a obtenção de polissacarídeos pécticos por meio de microfiltração, ultrafiltração e nanofiltração de um extrato de

polissacarídeos solúveis de soja com pH entre 4,5–6,5, tendo como vantagem o fácil controle do teor de cinzas e proteínas (HUA, Y. *et. al.* Membrane method for preparing pectic substance soybean water-soluble polysaccharide in grades. CN101880336 (A), Nov. 10, 2010). Semelhantemente CN101693746 patenteia um método de separação por ultrafiltração de polissacarídeos de soja após cozimento em pH ácido. Ao final os polissacarídeos sofrem precipitação alcoólica e spray-drying. O método apresenta as seguintes vantagens: economia de energia, não causa poluição, economia de tempo, processo pode ser expandido e os polissacarídeos de soja classificados por peso molecular podem ser aplicados em indústrias de alimentos (QI, J. Method for using membrane separation and classification to prepare soybean polysaccharides with different molecular weights. CN101693746 (A), Apr. 14, 2010).

[42] As técnicas apresentadas envolvem, muitas vezes, processos de custo elevado ou múltiplos estágios até obtenção do produto final. Processos que envolvem enzimas não são industrialmente convenientes para este tipo de produto, pois elevam o custo da produção devido ao preço das enzimas, normalmente demandam um longo período de tempo, provocando um *delay* ao processo, além de acrescentarem mais uma etapa ao processo devido à necessidade de inativação enzimática. Processos que envolvem micro-, ultra- e nanofiltração apesar de fornecerem produtos com tamanhos moleculares selecionados, também são onerosos. Membranas possuem alto custo e vida útil relativamente pequena devido ao entupimento dos poros. Processos que envolvem alto gasto de energia, como p.e. uso de micro-ondas, múltiplas etapas para obtenção do produto final, etapas com períodos longos de execução, necessidade de purificação e utilização de vários reagentes químicos são difíceis de serem empregadas industrialmente.

[43] O presente documento, de maneira diferente, desenvolveu um método de baixo custo, rápido e comercialmente mais conveniente para escalas industriais, além de fazer uso de um subproduto da indústria de óleo, agregando-lhe valor e reduzindo seus desperdícios. O processo para obtenção de um inibidor da adesão bacteriana aqui descrito foi combinado

de maneira inédita, gerando bioproduto que constituem alternativas tecnológicas economicamente viáveis e que se mostraram mais eficazes que bioproduto comercialmente disponíveis podendo assim ser para uso no tratamento e prevenção de doenças gastrointestinais.

Salmonelose

[44] Existe uma grande necessidade por parte das indústrias de alimentos/rações e da medicina humana e animal em criar métodos de defesa contra doenças causadas por enterobactérias, uma vez que infecções entéricas são uma das causas globais de mortalidade, chegando a mais de 2 milhões de mortes/ano (WILSON et al., 2002; PATON; MORONA; PATON, 2006; RASKO; SPERANDIO, 2010; GANNER et al., 2010).

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

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

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

[48] A salmonelose é transmitida principalmente através de aves (29% - carne; 18% - ovos), carne de porco (12%), carne bovina (8%). Juntas essas fontes são responsáveis por aproximadamente 70% da cadeia de

contaminação (CDC, 2011). Esses dados refletem que além de um problema de saúde humana, as doenças entéricas são um dos maiores problemas na pecuária (PATON; MORONA; PATON, 2006). Desta forma ao implantar medidas profiláticas contra infecções gastrointestinais em animais, o risco de transmissão pela cadeia alimentar será reduzido.

[49] O processo de infecção pela *Salmonella* acontece em três etapas: colonização, invasão e multiplicação bacteriana. A adesão de patógenos à superfície do epitélio do intestino (colonização) é a primeira etapa crítica do processo de infecção (OFEK; MIRELMAN; SHARON, 1977; LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998; WILSON *et al.*, 2002; OFEK; HASTY; SHARON, 2003; MORAN, 2011). Ela é mediada por fatores de aderência microbiana chamados de adesinas. Essas adesinas podem ser proteínas ou carboidratos.

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

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

[52] As fímbrias são filamentos proteicos que se projetam da superfície da bactéria e possuem capacidade de adesão devido à presença

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

Controle da contaminação por *Samonella* sp.

[53] Na pecuária os antibióticos promotores de crescimento (*Growth-Promoting Antibiotics*) têm sido usados com frequência nas últimas décadas com finalidade de controlar patógenos intestinais (reduzindo mortalidade) e como promotores de desempenho ou saúde animal (BOROWSKY, 2009; GANNER, 2011; FERKET, 2011). Uma das consequências mais importantes derivadas do uso prolongado desses antibióticos foi o surgimento de bactérias resistentes a este tipo de tratamento, além de causar diversos efeitos colaterais (SHARON; OFEK, 2000; SPRING; PRIVULESCU, 2012; HAJATI; REZAEI, 2010; GANNER, 2011). Conseqüentemente, pesquisas com alternativas ao uso de antibióticos têm sido intensificadas (SHARON; OFEK, 2000; BIGGS; PARSONS; FAHEY, 2007; GANNER, 2011). Alternativas naturais como óleos essenciais, leveduras, prebióticos, probióticos, oligossacarídeos, polissacarídeos, glicoconjugados são os focos de interesse e cada vez mais tem sido estudado (MORAN, 2011; GANNER, 2011; KEMPERMAN, R. A.; MELLEMA, M. Prebiotic use of water soluble soybean polysaccharide. WO 2011088943 (A1), Dec. 21, 2010; ZHAN, Y. A method of preventing animals from diseases and improving immune function of animals. EP 0826303 (A1), Mar. 04, 1998).

[54] Atualmente uma das alternativas, disponível comercialmente, ao uso de antibióticos com atividade comprovada, consiste em um produto constituído de parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A parede celular das leveduras é composta, predominantemente por β -glucanas (35-55%) e manoproteínas (30-50%) (KLIS; BOORSMA; GROOT, 2006; KOGAN; KOCHER, 2007). Atividades imunomoduladoras têm sido descritas para β -glucanas (BOHN; BeMILLER, 1995; KOGAN; KOCHER, 2007; BUSSIÈRE,

2010) e as manoproteínas estão sendo correlacionadas a atividades de adsorção bacteriana (OFEK; HASTY; SHARON, 2003; MORAN, 2011). Desta forma a característica dos manooligossacarídeos em aumentar a resistência do animal, contra doenças entéricas, e promover o crescimento é dada devido a sua capacidade de: 1) inibir a colonização de patógenos entéricos, bloqueando a adesão bacteriana (OFEK; HASTY; SHARON, 2003; SPRING; PIVUULESCU, 2012; MORAN, 2011); 2) aumentar a imunidade (FERKET, 2011); 3) e aumentar a barreira de muco no lúmen intestinal, através de produção de imunoglobulina A (MCKAY; PERDUE, 1993; BIGGS; PARSONS; FAHEY, 2007).

[55] Pesquisas com diferentes alternativas estão sendo divulgadas na última década. Parede celular de *Trichosporon mycotoxinivorans* aderiram enterobactérias *in vitro* (GANNER *et al.*, 2010). *Lactobacillus johnsonii* foi capaz de competir pelos mesmos receptores que bactérias enteropatogênicas (NEESER *et al.*, 2000). *Lactobacillus acidophilus* interferiu com o processo de adesão de *Salmonella* sp. (NAKAZATO *et al.*, 2011). Polissacarídeos sulfatados de microalgas inibiram o processo de citoadesão por *Helicobacter pylori* (GUZMAN-MURILLO; ASCENCIO, 2000). Leite e seus componentes (MARTÍN-SOSA; MARTÍN; HUESO, 2002; MARTÍN; MARTÍN-SOSA; HUESO, 2002), oxicoco (*cranberry*) (BURGUER *et al.*, 2000), cenoura, café, manga (BECKER *et al.*, 2007; BECKER; GALLETI, 2008) e soja (NEESER; KOELLREUTTER; WUERSCH, 1986; KIERS *et al.*, 2002; KIERS *et al.*, 2003; BECKER *et al.*, 2007; BECKER; GALLETI, 2008) foram capazes de adsorver enterobactérias *in vitro*.

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

[57] A principal desvantagem da terapia antiadesão está em que a maioria dos patógenos possui genes que codificam mais de um tipo de

adesina, de modo que durante o processo infeccioso, mais de uma destas adesinas pode ser expressa pela população de patógenos. A adesão pode também envolver outros fatores além de adesinas-receptores, tais como interações hidrofóbicas ou outras interações não-específicas. Para a terapia antiadesão ser completamente efetiva, é necessário o uso de múltiplos agentes que inibam especificamente cada tipo de adesina do patógeno infectante ou um simples agente com amplo espectro de atividade antiadesão (BECKER; GALLETI, 2008).

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

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

[60] Sacarídeos são, portanto, ideais como agentes antiadesão de

bactérias patogênicas, pois são atóxicos, não mutagênicos e não são bactericidas, evitando-se assim o risco de resistência (SHARON; OFEK, 2000). Cabe destacar que informações sobre suas fontes de obtenção, acessibilidade, concentração e possíveis estruturas dos receptores para adesão bacteriana ainda não estão explícitas. Mais estudos são necessários para elucidar tais informações (BECKER; GALLETI, 2008).

[61] Diversos são os documentos que relatam a atividade de carboidratos no tratamento e prevenção de doenças infecciosas causadas por bactérias.

[62] US6,001,819, US5,736,533 e WO9640169 referem-se a um método de tratar infecções respiratórias, causadas pelas bactérias *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *P. cepacia*, através da administração de um efetivo inibidor de ligação cuja sua formulação contém oligossacarídeos. As unidades oligossacarídicas contêm: galactose, glucose, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina, fucose e ácido *N*-acetilneuramínico. Estes podem ser obtidos a partir de síntese enzimática, síntese química ou degradação de oligossacarídeos, glicolipídeos e glicopeptídeos naturais ou isolados do leite humano (SIMON, O. M. *et.al.* Bacterial inhibition with an oligosaccharide compound. US6,001,819, Dec. 14, 1999; SIMON, O. M. *et. al.* Bacterial inhibition with an oligosaccharide compound. US5,736,533, Apr. 07, 1998; SIMON, O. M.; BARTHELSON, R. A.; JOHNSON, K. F. Bacterial inhibition with an oligosaccharide compound. WO9640169 (A1), Dec. 19, 1996).

[63] WO2007138047 relata o uso de tri e tetra-oligossacarídeos como agentes aglutinantes para patógenos. Em particular relata como utilizar esses oligossacarídeos para melhorar a flora do trato gastrointestinal do animal seguido de excreção específica de patógenos entéricos, melhorando o ganho de peso, reduzindo a conversão de alimentos e desta maneira aumentando a saúde e bem-estar do animal (BRUGGEMAN, G.; DESCHEPPER, K. Tri and tetra-oligo-saccharides suitable as agglutination agents for enteric pathogens. WO2007138047 (A2), Dec. 06, 2007).

[64] WO0165949 relata o uso de carboidratos (oligossacarídeos) não digeríveis na manufatura de uma composição para tratar e prevenir bactérias

patogênicas no intestino grosso de animais domésticos. As matérias-primas que dão origem a esses carboidratos são: fibras de coco, polpa de beterraba, chicória, farelo de arroz, alfarroba ou goma arábica (BAILLON, M. L.; GIFFARD, C. J. Treatment of infection in animals. WO0165949 (A1), Set. 13, 2001).

[65] WO0051644 refere-se a uma composição e método para tratar diarreia, especialmente às mediadas por *E. coli* enteropatogênica (EPEC), utilizando composições oligossacarídicas. As sequências oligossacarídicas envolvidas nas ligações à EPEC são compostas principalmente por: N-acetilgalactosamina, difucosil-lactose, isômeros de lacto-N-fucopentose; gangliosídeos GM₁, GM₂ e GM₃ e lactosamina ligada a glicoproteína (VANMAELE, R. P.; ARMSTRONG, G. D. Treatment or diarrhea caused by enteropathogenic *Escherichia coli*. WO0051644 (A1), Set. 08, 2000).

[66] EP0171026 relata um alimento utilizado na pecuária contendo inulo-oligossacarídeos em que uma a cinco unidades de frutose estão ligadas por ligações β -(1→2). Este alimento pode ser usado como método de promoção de crescimento e minimização de diarreias recorrentes durante o período de crescimento. Os inulo-oligossacarídeos são facilmente obtidos a partir de inulina de *Helianthus tuberosa* (HIDAMAKA, H.; EIDA, T.; HAMAYA, T. Livestock feed containing inulo-oligosaccharides and breeding of livestock by using the same. EP0171026 (B2), Oct. 02, 1991).

[67] EP0549478 é fornecer de um método de preparação de glucogalacto-oligossacarídeos que consistem essencialmente de glucose e galactose (1:1), obtidos pelo aquecimento de lactose na presença de um ácido inorgânico e água numa pequena quantidade (20%) na temperatura de 120–200°C por 5–20 s numa extrusora. Outro objetivo desta mesma invenção é a criação de um alimento para pecuária, usado preferencialmente durante período de crescimento, possibilitando a diminuição de diarreias e fezes pastosas (KATTA, Y. *et. al.* Method for preparing galacto-oligosaccharides and feed for livestock containing the same. EP0549478 (B1), Set. 17, 1997).

[68] WO2010120682 trata de um alimento ou composição farmacêutica para animais contendo um ou mais oligossacarídeos derivados

do leite, ou um glicoconjugado com a propriedade de tratar infecções em animais (MORROW, A. L.; NEW-BURG, D. S.; RUIZ-PALACIOS, G. M. Milk oligosaccharide compositions and use thereof in treating infection in animals. WO2010120682 (A1), Oct. 21, 2010).

[69] WO03045401 relata um método para melhorar a saúde e produção de ruminantes através da administração de quantidades efetivas de oligossacarídeos não digeríveis do grupo gluco- e/ou isomalto-oligossacarídeos. Estes oligossacarídeos são capazes de diminuir a incidência de diarreia e aumentar a lactação dos animais (LANE, R. L. Compositions and methods for animal treatment. WO03045401 (A1), Jun. 05, 2003).

[70] WO03028738 relata o uso de oligossacarídeos, neutros com cadeia linear ou ramificada, para prevenir a invasão e infecção de células de mamíferos por patógenos. A invenção relata seu uso em alimentos, produtos dietéticos e agentes farmacêuticos. Os oligossacarídeos consistem de uma cadeia principal composta por [Gal-HexNAc]-Gal-Glc, unidos entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1→3) ou β -(1→6) (STAHL, B. et. al. Anti-infectious carbohydrates. WO03028738 (A2), Apr. 10, 2003).

[71] WO9702829 reivindica um método para reduzir a duração de diarreia e seus episódios recorrentes em humanos através da administração de oligossacarídeos não digeríveis ou fruto-oligossacarídeos. Esses oligossacarídeos podem ser produzidos a partir de síntese enzimática, síntese química ou serem isolados de plantas. Sua forma de administração pode ser através de balas, tabletes, gomas, leite, iogurtes, produtos fermentados e produtos nutracêuticos (DOHNALEK, M. I. H.; OSTROM, K. M.; HILTY, M. D. Use of indigestible oligosaccharides to prevent and treat diarrhea. WO9702829 (A2), Jan. 30, 1997).

[72] US5,776,524 relata o processo de produção de uma ração animal útil para reduzir a quantidade de bactérias prejudiciais ao intestino delgado. A composição da ração animal contém, com base em uma matéria seca, de 0.2–1.5% de fruto-oligossacarídeos e é dada a um animal de estimação como cães, gatos ou cavalos. Esses fruto-oligossacarídeos ocorrem

naturalmente e podem ser encontrados em uma variedade de frutas e vegetais incluindo banana, alho, mel, cebola, açúcar mascavo, cevada, tomate e aspargo. Há três variedades de fruto-oligossacarídeos: 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄), sendo estes extraídos de plantas ou sintetizados quimicamente (REINHART, G. A. Process for treating small intestine bacterial overgrowth in animals. US5,776,524, Jul. 07, 1998).

[73] WO8903218, WO9107181, US4,902,674 e US4,987,124 reivindicam uma composição de fruto-oligossacarídeos que inibe o crescimento de *Salmonella* no intestino prevenindo infecções. A composição é fermentada por outras microfloras que competem com a *Salmonella*, produzindo metabólitos que inibem o crescimento da *Salmonella*. Os fruto-oligossacarídeos são caracterizados por moléculas de sacarose com 1–8 resíduos de frutose (SPEIGHTS, R. M.; PERNA, P. J. Method for inhibiting the growth of *Salmonella*. WO8903218 (A1), Apr. 20, 1989; SPEIGHTS, R. M.; PERNA, P. J.; DOWNING, S. L. Method for inhibiting the growth of *Salmonella*. WO9107181 (A1), May 10, 1991; SPEIGHTS, R. M. Method for inhibiting the growth of *Salmonella*. US4,902,674, Fev. 20, 1990; SPEIGHTS, R. M.; PERNA, P. J.; DOWNING, S. L. Method for inhibiting the growth of *Salmonella*. US4,987,124, Jan. 22, 1991).

[74] US5688777 envolve o uso de oligossacarídeos não digeríveis para tratar e prevenir infecções causadas por *C. difficile* (GAELEB, K. A. Inhibition of *C. difficile* infections by indigestible oligosaccharides. US5688777, Nov. 18, 1997).

[75] WO9826662 relata composições e métodos para tratar e prevenir doenças bacterianas e virais. Essas composições compreendem oligossacarídeos ligados a polímeros, mais especificamente, ligados à dendrímeros, inibindo a ligação dos microorganismos patogênicos a seus receptores localizados nas células hospedeiras. A fonte dos oligossacarídeos inclui glucoproteínas, glicosaminoglicanos e glicolipídeos (SCHENGRUND, C. L.; THOMPSON, J. Compounds and methods for treating and preventing bacterial and viral disease. WO9826662 (A1), Jun. 25, 1998).

[76] US7,893,041 trata de oligossacarídeos específicos ou

combinações de oligossacarídeos que podem ser usadas para tratar ou prevenir infecções causadas por vários agentes associados com desordens entéricas, infecções respiratórias, infecções vaginais, infecções do trato urinário, infecções oculares ou infecções na cavidade oral. Oligossacarídeos podem ser administrados sob as formas mono (um) ou polivalentes (dois ou mais). Em forma monovalente, oligossacarídeos livres podem ser administrados sozinhos ou em combinação. Os oligossacarídeos são compostos principalmente por um grupo fucose α -(1→2), α -(1→3), α -(1→4)-ligado à galactose (MORROW, A. L.; NEWBURG, D. S.; RUIZ-PALACIOS, G. M. Oligosaccharide compositions and use thereof in the treatment of infection. US7,893,041 (B2), Feb. 22, 2011).

[77] WO2011073112 relata derivados de α -Manp como antagonistas eficientes de adesão bacteriana, prevenindo e tratando infecções (ERNST, B.; HEROLD, J. Mannose derivatives as antagonist of bacterial adhesion. WO2011073112 (A2), Jun. 23, 2011).

[78] JP8173055 trata de um alimento para animais domésticos, contendo uma mistura de polissacarídeos com manose, que apresenta excelente produtividade e efetiva prevenção contra *Salmonella*. Os polissacarídeos são obtidos a partir de um tratamento enzimático de resíduos de polpa de coco (SHINICHI, H.; TAKASHI, K.; MITSURU, I. Mannose-based polysaccharide-containing feed. JP8173055 (A), Jul. 09, 1996).

[79] US5,703,060 trata de um método de prevenção e tratamento de infecções e infestações em animais através da administração de uma quantidade eficaz de um derivado de manana acetilada. Esta manana é extraída de mucilagem de *Aloe*, sua cadeia principal é composta de unidades β -D-Manp-(1→4)-ligadas. Resíduos de galactose estão presentes numa relação manose:galactose de 20:1 (MCANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; MCDANIEL, H. R. Uses of *Aloe* products in the prevention and treatment of infections and infestations. US5,703,060, Dec. 30, 1997).

[80] WO2009144070 relata uma pré-mistura para alimentos animais, com capacidade de inibir colonização de bactérias gram-negativas e promover crescimento animal, compreendendo: polímeros com conteúdo de

manose entre 10-100%, uma enzima β -mananase e um agente antiadesão com capacidade de inibir 20% das ligações bacterianas (BRUFAU, J. B. de *et.al.* An enzymatic pre-mixture against gram negative bacteria colonization in the animal intestinal tract. WO2009144070 (A2), Dec. 03, 2009).

[81] JP8099884 trata de um hidrolisado de polissacarídeos capaz de remover bactérias gram-negativas de mamíferos, aves e produtos animais como ovos, prevenindo desta forma a proliferação dessas bactérias. O hidrolisado de polissacarídeos é obtido a partir da hidrólise enzimática (galactomananase ou pectinase) de goma guar, goma de tamarindo, pectinas e goma xantana (TSUTOMU, O.; YUKIKO, N.; SHIGEMITSU, A. Supressant for proliferation of gram-negative bacterium. JP8099884 (A), Apr. 16, 1996).

[82] US6,126,961 reivindica uma composição de ração animal para reduzir a colonização por *Salmonella* e outras bactérias patogênicas em intestinos de animais. Essa composição inclui polissacarídeos naturais contendo unidades de manose e derivados, galactose e derivados, galactomananas, galactosamina, fucose e arabinose. Esses polissacarídeos são incorporados à ração e se ligam às adesinas dos patógenos (KROSS, R. D. Compositions and method for reducing the colonization of animal intestines by *Salmonella* and other bacterial pathogens. US6,126,961, Oct. 03, 2000).

[83] PT1357917, WO02060452 e EP1698341 relatam a utilização de carboidratos, não degradáveis pelo trato digestivo, no tratamento de infecções intestinais em animais causadas por bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Escherichia* e *Shigella*. Estes são constituídos por 1-O- α -D-glucopiranosil-D-sorbitol, 6-O- α -D-glucopiranosil-D-sorbitol, ácido lactobiônico e ácido maltobiônico (MUNIR, M. *et. al.* Utilização de hidratos de carbono para eliminar infecções intestinais em animais. PT1357917 (E), Dec. 17, 2001; KLINGEBERG, M. *et.al.* Use of carbohydrates for eliminating intestinal infections in animals. WO02060452 (A2), Aug. 08, 2002; KLINGEBERG, M. Use of carbohydrates for eliminating intestinal infections in animals. EP1698341 (A2), Set. 06, 2006).

[84] WO0054788 trata de uma composição farmacêutica para uso veterinário, contendo ácido láctico, carboidratos não digeríveis, sais de cálcio

e alumínio. Esta composição regenera a flora intestinal durante a diarreia ou síndromes dispépticas, atuando no tratamento de dismicrobismo após uso de antibióticos em doenças digestivas de animais (GALLI, G. Pharmaceutical composition for medical and veterinary use for regeneration intestinal flora in diarrhoea or dyspeptic syndrome. WO0054788 (A1), Set. 21, 2000).

[85] WO9956754 trata de composições contendo resíduos de fucose (1→2)-ligado. Essas composições podem ser usadas no tratamento e prevenção de infecções gastrointestinais causadas por *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* (PRIETO, P. A.; RUIZ-PALACIOS, G. M. Compositions containing na α 1,2-fucose linkage and uses thereof. WO9956754 (A1), Nov. 11, 1999).

[86] EP0089940 relata uma composição terapêutica utilizada no tratamento de infecções gastrointestinais causadas por bactérias gram-negativas, em especial *E. coli* K88+. O composto ativo funciona como receptor análogo à bactéria (LINDBERG, A. Compositions for therapeutic or diagnostic use containing oligosaccharides. EP0089940 (A1), Set. 28, 1983).

[87] WO8102520 reivindica composições utilizadas na terapêutica de infecções urinárias bacterianas contendo como constituinte ativo unidades terminais de α -D-Galp-(1→4)-D-Gal (KELLENIUS, G. et. al. Compositions for therapeutic or diagnostic use in connection with bacterial infections, and their use. WO8102520 (A1), Set. 17, 1981).

[88] PT103983 refere-se a composições contendo um ou dois polissacarídeos sulfatados, obtidos de macro e microalgas, com atividade antiviral e antibacteriana. Os polissacarídeos foram obtidos a partir de *Phorphyridium* sp., para tanto as culturas celulares foram centrifugadas (10000 rpm, 20 min), filtradas, precipitadas com etanol e dialisadas contra água destilada (VIEIRA, V. V.; MORAIS, R. M. S. C. de. Composições constituídas por polissacarídeos com atividade antiviral e antiadesão bacteriana, respectivas formulações, processo de elaboração das mesmas e suas utilizações. PT103983 (B), Feb. 02, 2008).

[89] US5,474,986 consiste em um método para tratar infecções causadas por bactérias uropatogênicas, principalmente *E. coli*, através de derivados modificados de galabiose nas posições 3' e anomérica. As

investigações indicam que modificações em mais de um grupo hidroxil resultam em uma redução drástica na habilidade do glicosídeo em inibir a aglutinação de células vermelhas por mutantes de *E. coli* (MAGNUSSON, H. G.; KIHMBERG, J. O. Method for treating galabiose-binding bacteria infections. US5,474,986, Dec. 12, 1995).

[90] US7,682,631 direciona-se a composições que previnem ou tratam infecções causadas por uma variedade de patógenos. Os materiais biofuncionais incluem glicolipídeos, glicoproteínas, peptídeos, polipeptídeos, lipídeos, monossacarídeos e polissacarídeos. Estes são idênticos aos receptores localizados na superfície de células hospedeiras, podendo ser reconhecidos e ligados pelas adesinas dos patógenos. Desta forma estas composições podem ser utilizadas para prevenir infecções entéricas, uma vez ligadas ao patógeno, este é facilmente removido do trato gastrointestinal (STUTZENBERGER, F. J. *et. al.* Adhesin-specific nanoparticles and process for using same. US7,682,631 (B2), Mar. 23, 2010).

[91] O objeto da presente invenção é o de proporcionar um bioproduto ativo mais específico a partir de farelo de soja melhorando os efeitos no ecossistema microbiano do trato gastrointestinal. Mais em particular, a invenção tem como objetivo proporcionar a obtenção de um bioproduto composto de proteínas e carboidratos que seletivamente controla o ecossistema microbiano do trato gastrointestinal de um animal, selecionando enteropatógenos e ocasionando sua devida excreção após ligação às adesinas fimbriais.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

[92] Doenças gastrointestinais causadas por enterobactérias continuamente são causas de morbidade e mortalidade em humanos, outros mamíferos, e outros animais como aves. Entre os problemas associados ao uso frequente de drogas no tratamento dessas doenças estão: falta de eficácia e/ou especificidade, toxicidade, e desenvolvimento de resistência bacteriana. Desta forma, agentes não-tóxicos e terapeuticamente eficientes são necessários para o tratamento dessas doenças. Nesta problemática,

focou-se encontrar uma alternativa ao uso dos antibióticos.

[93] Carboidratos e proteínas têm mostrado propriedades de atuar como receptores análogos às enterobactérias, de modo que os organismos patogênicos os reconheçam, e a adesão ao tecido hospedeiro seja inibida resultando em uma falta de capacidade para iniciar a infecção. A presente invenção trata de composições para tratar e prevenir infecções bacterianas, em particular, derivados de carboidratos e proteínas que atuem inibindo a ligação aos receptores nas células. Enquanto o mecanismo completo não é totalmente compreendido a presente invenção pode estar limitada a alguns mecanismos pelos quais o benefício é alcançado. Está então contemplado que, os derivados de carboidratos/proteínas na presente invenção mimetizam a porção glicídica/proteica dos receptores das células e assim fornecem um objeto alternativo para o micro-organismo. A presente invenção contempla que tais inibidores podem ser usados tanto para tratamento como prevenção de doenças causadas por enterobactérias (também como prevenção da propagação da infecção num indivíduo com a doença emergente).

[94] Portanto, o principal objetivo desta invenção é o processo de produção de um inibidor da adesão bacteriana a partir de farelo de soja, com potencial de adsorver enterobactérias, segundo os processos e etapas aqui descritos.

[95] O primeiro objeto desta invenção trata dos processos químicos, de preparação e produção de um produto inibidor da adesão bacteriana a partir de farelo de soja, contendo alto teor de proteínas e carboidratos modificados. A presente invenção, de maneira diferente ao estado da arte, mostra-se como um método: (A) barato - uso de reagentes químicos de baixo valor e em poucas quantidades; (B) rápido – pequeno número de etapas; (C) que não exige purificações adicionais obrigatórias; (D) de fácil escalonamento; (E) utiliza matéria-prima disponível em alta escala e de baixo custo; (F) resulta em agregação de valor à subproduto da indústria de óleo.

[96] O segundo objeto desta invenção trata do uso dos referidos inibidores da adesão bacteriana obtidos a partir de farelo de soja na prevenção e/ou tratamento de doenças gastrointestinais, em animais

mamíferos e/ou aves, causadas principalmente por enterobactérias, em especial, *Salmonella enterica* sv. Typhimurium.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURA

[97] A seguir, faz-se referência ao desenho anexo ao texto para melhor compreensão dos exemplos e concretizações apresentados:

[98] Figura 1: trata-se de um fluxograma que ilustra o processo de produção do inibidor da adesão bacteriana a partir de farelo de soja com capacidade de adsorção bacteriana. Os números representam as seguintes operações: 1- diluição, ajuste pH, primeiro tratamento termoquímico sob alta pressão e filtração; 2- ajuste pH e centrifugação; 3- segundo tratamento termoquímico sob alta pressão, diálise e liofilização. As siglas: SOB, PPT, RES representam sobrenadante, precipitado e resíduo, respectivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[99] O processo proposto na presente invenção está representado na Figura 1 em forma de fluxograma. A seguir será detalhada a série de etapas deste processo, desde a preparação inicial das matérias-primas até a obtenção final inibidor da adesão bacteriana a partir de farelo de soja.

[100] A matéria-prima utilizada é o farelo de soja, obtido após extração mecânica e/ou química de óleo dos grãos de soja. As características da matéria-prima utilizada são fundamentais e podem interferir na geração do produto final. O farelo de soja deve possuir no máximo 10% de óleo residual, estar isento da presença de solventes orgânicos utilizados durante o processamento para extração de óleo e seco apresentando umidade entre 5–20%. Às vezes a matéria-prima não está em conformidade para uso e necessita passar por tratamentos prévios. Vários tipos de adequação podem ser incluídos a critério do operador. Entre as opções estão ajuste da granulometria, secagem, homogeneização e esterilização.

[101] Numa primeira etapa, o tratamento termoquímico é realizado em meio aquoso, tamponado ou não, numa concentração de 100–500 g/L, com pH menor que 9, preferencialmente entre (0–3) e (6–8). O ajuste do pH é

dado com a utilização de ácidos, preferencialmente ácido clorídrico, ou agentes alcalinos, preferencialmente hidróxido de sódio. A utilização de algum desses compostos químicos pode ser suficiente, no entanto pode-se usar a combinação de dois ou mais tipos de compostos para o ajuste do pH.

[102] A temperatura varia de 100–130°C, preferencialmente entre 115–125°C. Na presente invenção, o tratamento termoquímico deve ser realizado sob a aplicação de pressão relativa entre 0,25–1,5 atm, preferencialmente entre 0,75–1,25 atm, por 30–120 minutos. Períodos menores que 30 minutos não originam bioprodutos ativos, devido ao fato de não ocasionarem hidrólise parcial do material, períodos de tempo maiores que 120 minutos nestas temperaturas podem resultar em hidrólise excessiva do material. A temperatura deve ser monitorada e mantida constante durante todo o processo.

[103] Após o referido tratamento termoquímico, a mistura é processada usando meios adequados, tais como, coador de pano, papel filtro, sistema de filtração à vácuo, tela metálica ou centrifugação. O resíduo sofre então um processo de secagem ou liofilização, para retirada da umidade, e pode ser utilizado em novo ciclo de extração, resultando em aumento do rendimento final.

[104] A segunda etapa inicia-se com a neutralização do sobrenadante obtido após o processo de filtração. Esta neutralização (pH 6,0–8,0) é realizada da mesma forma que na etapa anterior, através da utilização de ácidos ou agentes alcalinos. Após neutralização o material deve ser centrifugado. O resíduo obtido pode ser liofilizado e reunido ao resíduo obtido na primeira etapa.

[105] Numa terceira etapa o sobrenadante obtido é submetido a um novo ciclo de tratamento termoquímico, semelhante ao processo já descrito, com temperatura entre 100–130°C, sob a aplicação de pressão relativa entre 0,25–1,5 atm, preferencialmente entre 0,75–1,25 atm, por 10–45 minutos. A temperatura deve ser monitorada e mantida constante durante todo o processo. Após a realização da etapa adicional, deve-se proceder com uma redução de volume. O material é então seco, resultando em um bioproduto

inibidor da adesão bacteriana.

[106] O bioproduto então obtido é composto de: 20–70% de proteínas e 10–60% de carboidratos. Análises adicionais evidenciaram que esses carboidratos são compostos principalmente por unidades de β -D-galactopiranosose unidas por ligações β -(1→4).

[107] Para melhorar os processos de extração e recuperação, o material pode ser submetido a processos físicos ou químicos conhecidos, tais como o uso de sonicação, homogeneização, uso de tensoativos, etc.

[108] O grau de purificação não influencia no aumento da atividade de adsorção bacteriana, portanto o bioproduto inibidor da adesão bacteriana obtido não exige obrigatoriamente mais etapas de purificação. No entanto esses processos subsequentes de purificação foram previstos e podem ser realizados no bioproduto de farelo de soja obtido após processos termoquímicos sob alta pressão. A utilização de enzimas proteolíticas, tais como protease, peptidase (pepsina, tripsina, papaína, subtilisina, bromelina, etc.) para hidrólise das proteínas e ácidos fortes (ácido tricloroacético) ou soluções de sulfato de amônio que provocam a precipitação das proteínas. Solventes orgânicos polares (etanol, metanol, isopropanol, n-propanol, acetona, etc.), preferencialmente etanol, em proporção de 1:5 (v/v), podem ser adicionados com a finalidade de precipitar macromoléculas. Após purificação o bioproduto então obtido é composto de: 5–40% de proteínas e 25–70% de carboidratos. Análises adicionais evidenciaram que os carboidratos presentes não se alteram e continuam compostos principalmente por unidades de β -D-galactopiranosose unidas por ligações (1→4).

[109] A determinação da capacidade de adsorção a enterobactérias foi realizada por bioensaios *in vitro*. Nos bioensaios, os bioprodutos resultantes do processo foram diluídos, na proporção adequada para se chegar à concentração final estabelecida.

[110] Os exemplos desta invenção servem para comprovar que os bioprodutos resultantes do processo aqui descrito e etapas posteriores de purificação (opcionais) são efetivos na produção de um inibidor da adesão

de enterobactérias.

[111] Para determinação da capacidade de adsorção foi utilizado a adaptação das metodologias propostas por Becker *et al.* (2007) e Ganner *et al.* (2010). Estas metodologias determinam *in vitro* a capacidade de ligação à bactérias enteropatogênicas através da relação densidade óptica (OD) x unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

[112] Os ensaios realizados com os bioprodutos inibidores de adesão bacteriana foram estatisticamente válidos e significativamente diferentes em relação ao controle de ligação (este funciona como um controle negativo). Os bioprodutos inibidores de adesão bacteriana obtidos a partir de farelo de soja mostraram-se com capacidade semelhante ao do controle positivo. Dentro destas circunstâncias, os resultados obtidos comprovam que os passos do processo proposto são eficazes para produção de um inibidor da adesão de enterobactérias.

[113] Esta invenção também se refere ao uso do referido inibidor de adesão bacteriana tratamento de doenças causadas por enterobactérias, sobretudo no caso de salmoneloses, pela administração de quantidade eficaz do inibidor de adesão de farelo de soja. Assim, o bioproduto pode ser utilizado na prevenção e no tratamento de doenças gastrointestinais.

[114] O bioproduto inibidor da adesão bacteriana pode ser usado *in vivo*, associado a ração, para tratar animais infectados ou suspeitos de estarem infectados com enterobactérias. Isto possibilita eliminar ou prevenir a transmissão para seres humanos a partir de animais. Ressalta-se que a composição final deve necessariamente incluir uma quantidade eficaz de algum dos bioproduto de processo propostos.

EXEMPLOS

[115] A presente invenção é explicada em mais detalhes pelos exemplos a seguir, porém não é limitada pelos referidos exemplos.

Exemplo 1 – Processo de obtenção de um inibidor da adesão de enterobactérias a partir de farelo de soja

[116] O farelo de soja diluído em água destilada (150 g/L) teve seu

pH ajustado para 2,0 com HCl 1 M, e foi submetido a uma pressão relativa de 1 atm, 121°C por 1 h. Após este tratamento o material foi filtrado, neutralizado com NaOH 0,5 M e centrifugado. O sobrenadante foi novamente submetido ao processo termoquímico de alta pressão por mais 15 min, em seguida foi concentrado, dialisado contra água destilada, novamente concentrado, liofilizado e denominado de EA. A composição do bioproduto de farelo de soja obtido é mostrada abaixo (Tabela 1). No espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C é possível identificar a presença de sinais característicos de carboidratos (110–60 ppm) e proteínas (10–55, 130, 170–180 ppm). A região anomérica (110–90 ppm) apresenta um sinal principal em 104,4 ppm referente ao C-1 das unidades de β -D-Galp (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; LIMA, 2008). São observados sinais em 77,6; 74,5; 73,5; 72,1; 60,9 ppm, correspondentes ao C-4, C-5, C-3, C-2 e C-6, respectivamente, das unidades de β -D-Galp-(1→4)-ligadas (GORIN; MAZUREK, 1975; FRANSEN *et al.*, 2000; LIMA, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Análises químicas e de composição monossacarídica da fração obtida

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
EA	13,4	59,8	30,8	3,5	1,2	19,8	6,2	1,2	31,7	5,5	30,8

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; ^aRendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^bLOWRY *et al.* (1951); ^cDUBOIS *et al.* (1956); ^dMonossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por GLC; ^eFILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991).

Exemplo 2 – Processo de purificação do bioproduto inibidor da adesão de enterobactérias a partir de farelo de soja

[117] O bioproduto de farelo de soja obtido no exemplo 1 foi dissolvido (2,5% p/v) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e uma protease – Pronase E (1% p/p) foi adicionada. As misturas foram então incubadas a 37°C, por 24 h. Após o período de incubação, a enzima foi inativada (80°C, 20 min),

a suspensão foi centrifugada e os sobrenadantes foram dialisados contra água destilada, em e liofilizados, resultando na fração EAte. A composição do bioproduto de farelo de soja obtido é mostrada abaixo (Tabela 2). O espectro de RMN de ^{13}C da fração EAte, mostra perfil semelhante ao da fração EA. Na região anomérica (110–90 ppm) é possível visualizar um sinal intenso em 104,4 ppm referente às unidades de β -D-Galp (FRANSEN *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2004; LIMA, 2008). São observados também deslocamentos químicos em 77,6; 74,5; 73,5; 72,1; 60,9 ppm, correspondentes ao C-4, C-5, C-3, C-2 e C-6, respectivamente, das unidades de β -D-Galp-(1→4)-ligadas (GORIN; MAZUREK, 1975; FRANSEN *et al.*, 2000; LIMA, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Análises químicas e de composição monossacarídica da fração obtida

Fração	Rendimento (%) ^a	PTN (%) ^b	Carboidratos Totais (%) ^c	Composição Monossacarídica (mol%) ^d							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA ^e
EAte	32,1	8,8	65,5	7,1	1,6	7,6	7,8	1,4	38,8	0,9	34,9

PTN: Proteínas; UA: Ácidos Urônicos; Rha: Ramnose; Fuc: Fucose; Ara: Arabinose; Xyl: Xilose; Man: Manose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; ^aRendimento em relação à massa seca de farelo de soja inicial; ^bLOWRY *et al.* (1951); ^cDUBOIS *et al.* (1956); ^dMonossacarídeos neutros quantificados na forma de acetatos de alditóis por GLC; ^eFILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991).

Exemplo 3 – Avaliação da capacidade de adsorção a enterobactérias

[118] Os testes foram realizados com a enterobactéria *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028, mantidas em meio BHI. A primeira etapa do protocolo consiste em confeccionar um gráfico log UFC (Unidades Formadoras de Colônias) x tempo de detecção. O tempo de detecção corresponde ao tempo necessário para alcançar a densidade óptica de 0,1 quando do crescimento bacteriano. O tempo de detecção foi determinado a partir de regressão não linear conforme descrito em Becker *et al.* (2007).

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

[120] Para as leituras das densidades ópticas, foram utilizadas placas de poliestireno de alta aderência, previamente bloqueadas com BSA, preenchidas com 200 µL de meio TSB (*Tryptic Soy Broth*), incubadas a 37°C, por 8 h em leitor de microplacas, fornecendo leituras das densidades ópticas em 690 nm a cada 15 min. O bloqueio dos poços se deu através da incubação de 300 µL de uma solução de BSA 1% por 1 h a 4°C, seguida da lavagem com 300 µL de PBS por 3 vezes. Cada diluição foi plaquada em quintuplicata. Ao final uma curva foi plotada, onde log UFC se encontra no eixo das ordenadas e tempo de detecção no eixo das abcissas.

[121] Soluções das amostras numa concentração de 1% foram dissolvidas em PBS, agitadas em vórtex e homogeneizadas em banho de ultrassom por 30 segundos por três vezes. Em seguida 300 µL dessa suspensão foram transferidos em quintuplicata aos poços da placa de poliestireno de alta aderência. Após incubação a 4°C durante 16-18 h, a placa foi lavada três vezes com 300 µL de PBS por poço. O bloqueamento dos espaços não ocupados pelo bioproduto e a prevenção de ligações inespecíficas se deu com 300 µL de BSA 1%, 4°C, durante 1 h, seguida de lavagem com 300 µL de PBS por três vezes. Após crescimento da bactéria e devida diluição, foram adicionados aos poços 300 µL da suspensão bacteriana, e incubadas durante 60 min a 37°C para permitir sua ligação ao bioproduto testado. Após lavagem por seis vezes com 300 µL de PBS, para retirar as bactérias que não se ligaram ao bioproduto, foi adicionado 200 µL de TSB, e uma gota de óleo de parafina, para que não haja evaporação do meio. Assim a placa foi incubada em leitor de microplacas a 37°C com leituras a cada 15 min a 690 nm, por 16 h.

[122] O controle de ligação consistiu em poços contendo apenas o bloqueio com BSA e a bactéria sem adicionar o bioproduto a ser testado. O controle de crescimento consistiu em poços previamente bloqueados com BSA, contendo uma solução de bactérias em meio TSB, de modo que se possa acompanhar algum problema durante o crescimento das bactérias. Brancos de cada amostra também foram plaqueados, estes consistiram em poços previamente bloqueados com BSA, contendo o bioproduto a ser testado sem adição de bactérias. Como controle positivo foi utilizado um bioproduto comercial proveniente de levedura *S. cerevisiae*.

[123] A quantidade de números de adesão (UFC/3mg) entre bactérias e amostras de interesse está listada na Tabela 3. Elas foram calculadas baseadas na regressão linear obtida a partir da curva padrão ($y = -0,9854x + 9,559$, $R^2 = 0,9925$) de modo que 99,25% dos resultados estão representados por esta curva.

Tabela 3 – Tempo de detecção e quantidade de bactéria ligada por 3 mg da fração testada

Frações	$t_{OD=0,1}$ (h)	UFC/3mg
EA	4,25	$2,36 \times 10^5$ ^a
EN	4,34	$1,93 \times 10^5$ ^a
ENte	4,65	$9,53 \times 10^4$ ^a
Controle Positivo	4,88	$5,61 \times 10^4$ ^a
EAt	4,92	$5,19 \times 10^4$ ^a
Controle Negativo (BSA)	6,19	$2,85 \times 10^3$ ^b

$t_{OD=0,1}$: Tempo de detecção para densidade óptica de 0,1; EA: Fração solúvel obtida a partir de uma extração ácida; EN: Fração solúvel obtida a partir de uma extração neutra; EAt: Fração obtida após tratamento de EA com proteinase; ENte: Fração obtida após tratamento de EN com proteinase; ^{a,b}Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey: $P < 0,05$). ^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey: $P < 0,01$).

[124] A fração EA apresentou a maior quantidade de células ligadas/3 mg (massa da fração testada por poço da placa), $2,36 \times 10^5$ UFC; seguida pelas frações EN, ENte e EAt que apresentaram quantidades de

células bacterianas ligadas entre $1,93 \times 10^5$ e $5,19 \times 10^4$ UFC. Todas as frações diferenciaram-se significativamente do controle negativo (BSA). Os resultados não mostraram diferença significativa ao controle positivo, porém são importantes, uma vez que apresentaram resultados estatisticamente equiparáveis a capacidade de ligação do bioproduto comercial testado. Estas frações são semelhantes, tendo a galactose como açúcar majoritário, mesmo após o tratamento enzimático.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de um inibidor da adesão bacteriana obtido a partir do farelo de soja, **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas sequenciais:

- (a) preparação de uma suspensão aquosa de farelo de soja com pH menor que 9;
- (b) submissão da suspensão de farelo de soja a um primeiro tratamento termoquímico sob alta pressão realizado em faixa de temperatura entre 110–130°C e pressão relativa entre 0,25–1,5 atm;
- (c) recuperação do material tratado derivado de farelo de soja e ajuste do pH para 6–8;
- (d) ressubmissão do material tratado de farelo de soja a um segundo tratamento termoquímico sob alta pressão realizado em faixa de temperatura entre 110–130°C e pressão relativa entre 0,25–1,5 atm;
- (e) Recuperação e processamento físico-químico da fração inibidora da adesão bacteriana contendo proteínas e carboidratos obtida após etapas A–D.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo preparo da suspensão de farelo de soja descrito na etapa A consistir em solubilização do farelo de soja em água ou meio tamponado numa concentração de 100–500 g/L.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo de pH da suspensão de farelo de soja, descrito na etapa A, ser ajustado para menor que 9, preferencialmente entre 0–3 e entre 6–8.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelos tratamentos termoquímicos serem realizados em pressão relativa entre 0,25–1,5 atm, preferencialmente entre 0,75–1,25 atm.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o primeiro tratamento termoquímico sob alta pressão, descrito na etapa B, ser aplicado a suspensão de farelo de soja por 30–120 minutos, e o segundo tratamento termoquímico sob alta pressão, descrito na etapa D, ser aplicado a suspensão de farelo de soja por 10–45 minutos.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a fração inibidora da adesão bacteriana proveniente do tratamento termoquímico sequencial sob alta pressão ao farelo de soja, descrito na etapa E, ser processada através de meios de separação, compreendendo filtração, centrifugação, prensagem, ou quaisquer combinações destes.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a fração inibidora da adesão bacteriana proveniente do tratamento termoquímico sequencial sob alta pressão ao farelo de soja, descrito na etapa E, ser processada através de meios de purificação compreendendo diálise, cromatografia, ultrafiltração, uso de enzimas proteolíticas, ácidos fortes, solventes orgânicos polares, ou quaisquer combinações destes.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a fração inibidora da adesão bacteriana proveniente do tratamento termoquímico sequencial sob alta pressão ao farelo de soja, descrito na etapa E, ser processada através de secagem ou liofilização.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizado** pelo fato de a fração inibidora da adesão bacteriana proveniente do tratamento termoquímico sequencial sob alta pressão ao

farelo de soja compreender entre 20–70% do peso seco do material de proteínas e entre 10–60% do peso seco do material de carboidratos.

10. Processo, de acordo com as reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de os carboidratos compreenderem polissacarídeos, preferencialmente polissacarídeos do tipo β -Galactana (1→4)-ligada.

11. Composição para alimentação animal que reduz a colonização intestinal de *Salmonella* ou outras bactérias enteropatogênicas **caracterizada** pelo fato de compreender um inibidor da adesão bacteriana obtido a partir de farelo de soja contendo proteínas e carboidratos associado a um alimento animal.

FIGURA

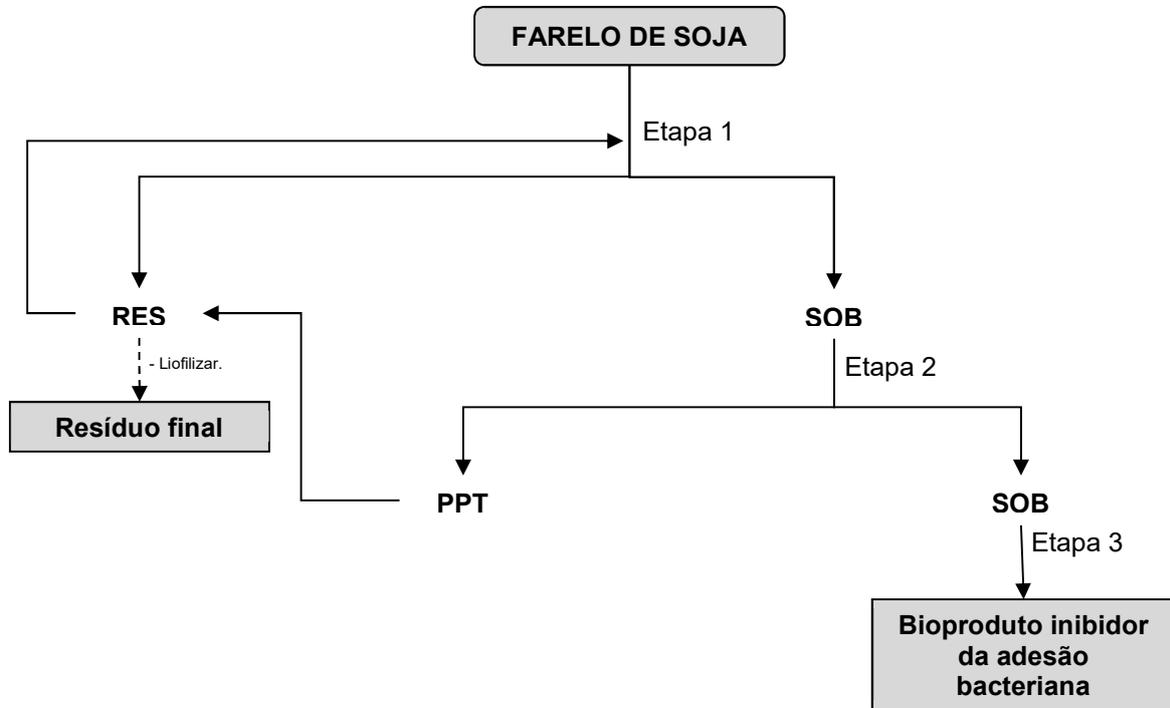


Figura 1