



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Cyntia da Silva de Freitas**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA A PARTIR DOS GRÃOS E FARELO DE SOJA (*Glycine  
max*)**

**RIO DE JANEIRO  
2014**

Cyntia da Silva de Freitas

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA A PARTIR DE GRÃOS E DE FARELO DA SOJA (*Glycine  
max*)

Dissertação de mestrado apresentada ao  
programa de pós-graduação em Ciência  
de Alimentos da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências.

Orientadores: Vânia Margaret Flosi Paschoalin  
Patricia Ribeiro Pereira

Rio de Janeiro  
2014

F866

Freitas, Cyntia da Silva de.

Extração e purificação parcial de peptídeos com atividade antimicrobiana a partir de grãos e de farelo da soja (*Glycine max*). / Cyntia da Silva de Freitas. – Rio de Janeiro: UFRJ, 2014.

62 p., il.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2014.

Orientadores: Vânia Margaret Flosi Paschoalin e Patricia Ribeiro Pereira.

1. *Glycine max*. 2. Farelo da soja. 3. Peptídeos antimicrobianos. I. Paschoalin, Vânia Margaret Flosi. II. Pereira, Patricia Ribeiro. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDD 664

Cyntia da Silva de Freitas

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA A PARTIR DE GRÃOS E DE FARELO DA SOJA (*Glycine  
max*)

Orientadores: Vânia M. F. Paschoalin  
Patricia Ribeiro Pereira

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de Março de 2014.

**Banca Examinadora**

---

Vânia M. F. Paschoalin  
Doutora  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Maria Alice Zarur Coelho  
Doutora  
Escola de Química  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Marcia Regina Soares da Silva  
Doutora  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pelo dom da vida, pelos conhecimentos e sabedoria. E só cheguei aqui porque até aqui me ajudou o Senhor.

À minha mãe Sandra e ao meu pai José, pois sempre acreditaram e investiram em mim. A minha avó Marly que sempre foi um grande exemplo para a minha vida e em quem sempre me inspirei. Ao meu avô por ter acreditado em mim.

Aos meus irmãos por serem “irmãos”.

Às minhas duas grandes amigas, Mariana Tavares Melo e Luciana Oliveira que sempre me deram força, oraram e acreditaram que eu seria capaz. Há amigos mais chegados que irmãos.

Não posso esquecer a Beatriz Oliveira; “Que a força esteja com você”.

À minha orientadora Vânia M. F. Paschoalin por ter me recebido no laboratório e ter sido forte como ela tem sido.

À minha co-orientadora Patricia Ribeiro Pereira, por ter sido meu braço direito e ter sido mais que co-orientadora, uma amiga. Foi um prazer inenarrável trabalhar com ela.

Ao Eduardo Mere por ter me recebido de braços abertos e com muita paciência. Obrigada pela ajuda que tem me dado e também pela amizade. Mais quatro anos pela frente.

Ao Rafael Luís, pelos momentos de descontração, sua disposição em ajudar e por me salvar em vários momentos.

À todos os meus amigos que sempre me incentivaram e apoiaram.

Agradeço a todos os amigos do LAABBM, por momentos de união e descontração. Que o poder do nitrito sempre esteja com você.

*In memoriam* ao Professor Joab Trajano Silva

*“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução”.*

(Bíblia sagrada- Provérbios: capítulo 1, versículo 7)



## RESUMO

Freitas, Cyntia da Silva de. **EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA A PARTIR DE GRÃOS E DE FARELO DA SOJA (*GLYCINE MAX*)**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Instituto de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A soja *Glycine max* (L). Merrill é um produto agrícola rico em lipídios e proteínas, de grande interesse mundial devido a sua importância na alimentação humana e animal. Tradicionalmente, ela é processada gerando alimentos à base desse grão ou ingredientes para a indústria de alimentos. A extração do óleo da soja produz um resíduo sólido ainda mais rico em proteínas e peptídeos bioativos, o farelo da soja. O objetivo deste trabalho foi extrair e purificar parcialmente peptídeos bioativos a partir de grãos e farelo de soja. A extração dos peptídeos foi realizada usando água destilada (extrato aquoso) ou usando etanol 40% (extrato etanólico) tanto do grão quanto do farelo da soja. O fracionamento dos extratos por HPLC e SDS-PAGE revelou a presença de proteínas de baixa massa molecular. O extrato aquoso na concentração de 0,25 mg/mL inibiu em 100% o crescimento da cultura de referência *Acinetobacter* genomospecies 3, já o extrato etanólico não apresentou atividade. Os peptídeos obtidos por extração aquosa inibiram parcialmente (21%) o crescimento de *Listeria innocua* e totalmente o crescimento de *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli* nas concentrações de 3,0; 3,0; 1,5; 2,0 e 0,7 mg/mL, respectivamente com os extratos obtidos de grãos e de farelo. O extrato do farelo da soja foi fracionado em cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose) e duas frações foram eluídas com 0,2M de NaCl. Ambas as frações apresentaram 57,4 e 18,7% de atividade antimicrobiana contra a cultura de referencia. Estes resultados comprovam que o uso de um método simples, e de baixo custo é eficiente para a extração de peptídeos bioativos do farelo da soja, resultando na purificação parcial de duas frações com atividade antimicrobiana. O resíduo industrial da soja mostrou ser um subproduto rico em produtos de alto valor agregado e que poderão ser utilizados na preservação de alimentos.

**Palavras chave:** *Glycine max*, farelo da soja, peptídeos antimicrobianos, extrato aquoso

## ABSTRACT

Freitas, Cyntia da Silva de. **EXTRACTION AND PARTIAL PURIFICATION PEPTIDES WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM SOYBEAN (*Glycine max*) SEED AND MEAL**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Instituto de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Soybean is an agricultural product rich in lipids and proteins and it has great interest worldwide due to their importance in human and animal nutrition. Traditionally, the grains are processed producing foods or ingredients for the food industry. The oil extraction from soybeans results in a solid sub-product richer in proteins and bioactive peptides than the grains, the soybean meal. The aim of this study was to extract and purify partially bioactive peptides from soybean seeds and meal. The extraction of peptides was performed using distilled water (aqueous extract) or using 40% ethanol (ethanolic extract). The fractionation of the extracts by HPLC and SDS-PAGE revealed the presence of low molecular weight proteins. The aqueous extract at the concentration of 0.25 mg/mL inhibited 100% of the growth of the reference strain *Acinetobacter* genomospecies 3, and the ethanol extract showed no activity. The peptides obtained by aqueous extraction from both, seeds and meal, inhibited partially (21%) the growth of *Listeria innocua* and totally (100%) the growth of *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* coagulase negative, *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli* when used at the concentrations of 3.0, 3.0, 1.5, 2.0 and 0,7 mg/mL, respectively, with the extracts obtained from seeds and meal of soybeans. The soybean meal extract was fractionated on ion exchange chromatography colun (DEAE-Sepharose) and two fractions were eluted with 0.2M NaCl. Both fractions showed 18.7 and 57.4% of antimicrobial activity against to reference strains. These results demonstrated that the use of simple, efficient and low cost method for the extraction of bioactive peptides from soybean meal, can result in a partial purification of two peptides with antimicrobial activities. The soybean industrial residue proved to be rich in high value-added products and could be used in food preservation.

**Keywords:** *Glycine max*, soybean meal, antimicrobial peptides, aqueous extract

## SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de figuras .....	xii
Lista de tabelas .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>p. 14</b>
1.1. Soja ( <i>Glycine max</i> ) .....	p. 14
1.2. Composição da soja .....	p. 17
1.3. Resíduo agroindustriais e produção do farelo da soja .....	p. 20
1.4. Peptídeos bioativos .....	p. 24
1.5. Peptídeos antimicrobianos .....	p. 25
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>p. 32</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>p. 33</b>
3.1. Objetivo geral.....	p. 33
3.2. Objetivos específicos.....	p. 33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>p. 34</b>
4.1. Organismos .....	p. 34
4.2. Extração peptídeos .....	p. 34
4.2.1. Extração com Etanol 40% .....	p. 34
4.2.2. Precipitação de proteínas com acetona .....	p. 35
4.2.3. Extrato Aquoso .....	p. 35
4.3. Determinação do teor de proteína .....	p. 35
4.4. Análise por SDS-PAGE .....	p. 35
4.4.1. Descrição do sistema .....	p. 36

4.4.2. Gel de resolução .....	p. 36
4.4.3. Gel de empilhamento .....	p. 36
4.4.4. Preparação das amostras .....	p. 37
4.4.5. Condições de eletroforese .....	p. 37
4.4.6. Coloração do gel .....	p. 37
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana .....	p. 38
4.5.1. Teste de atividade antimicrobiana .....	p. 38
4.6. Cromatografia de exclusão por tamanho .....	p. 39
4.7. Cromatografia de troca iônica .....	p. 39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>p. 40</b>
5.1. Extração de peptídeos .....	p. 40
5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana .....	p. 43
5.3. Purificação parcial do farelo da soja por cromatografia de troca iônica .....	p. 47
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>p. 51</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>p. 52</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>p. 53</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>p. 61</b>

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Mapa de produção agrícola da soja ..... p. 15
- Figura 2.** Representação das propriedades dos peptídeos bioativos da soja ..... p. 16
- Figura 3.** Etapas de processo da soja ..... p. 22
- Figura 4.** Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos ..... p. 29
- Figura 5.** Fracionamento dos extratos obtidos do grão de soja para análise do perfil de peptídeos por SDS-PAGE e HPLC ..... p. 40
- Figura 6.** Fracionamento dos extratos obtidos do grão e farelo da soja para análise do perfil de peptídeos por SDS-PAGE e HPL ..... p. 42
- Figura 7.** Cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose do extrato do farelo da soja e SDS-PAGE dos picos obtidos ..... p. 48

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Componentes funcionais da soja e seu efeito ..... p. 17
- Tabela 2.** Tabela de comparação dos compostos do grão e farelo da soja ..... p. 23
- Tabela 3.** A atividade antimicrobiana do extrato aquoso e etanólico de grãos da soja contra *A. genomospecies 3* (cultura de referência) ..... p. 44
- Tabela 4.** A atividade antimicrobiana do extrato aquoso do farelo da soja e do grão da soja ..... p. 45
- Tabela 5.** Atividade antimicrobiana das frações aniônicas (*Acinetobater genomospecies 3*) ..... p. 49

## 1. Introdução

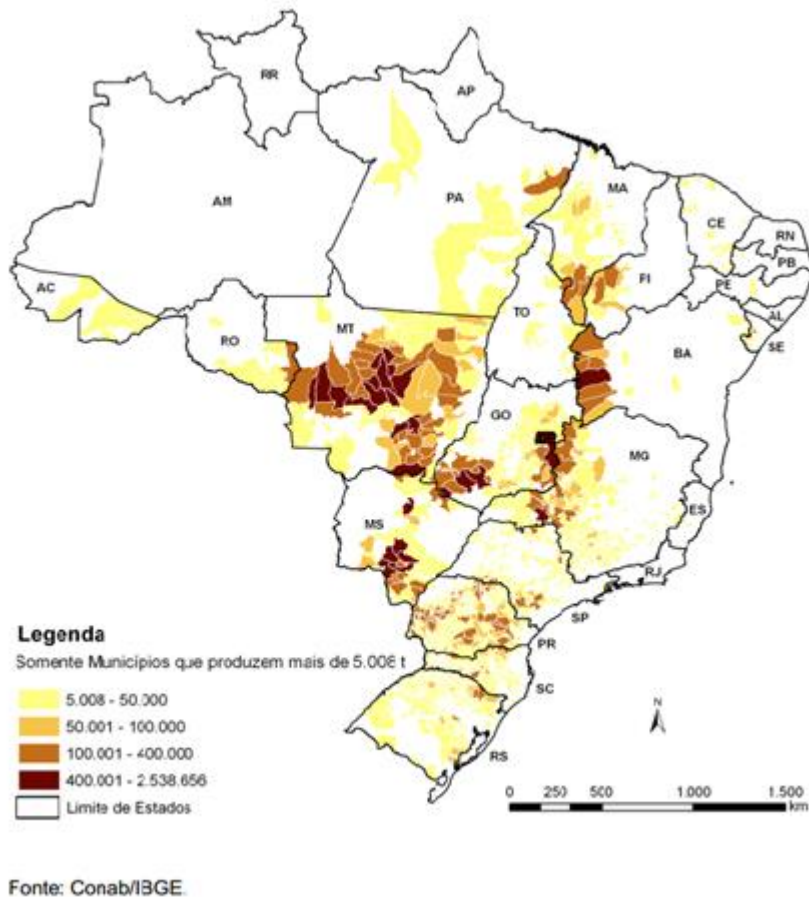
### 1.1. Soja (*Glycine max*)

A soja pertence à família *Leguminosae*, à subfamília *Papilionoideae* e ao gênero *Glycine*, L. A forma cultivada no Brasil é denominada *Glycine max* (L.) Merrill, que cresce anualmente (Liu, 1997). É um produto agrícola de grande interesse mundial graças à versatilidade de aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional (Mello *et al.*, 2004).

No Brasil, o agronegócio da soja teve sua expansão na década de 1970, ganhando competitividade e elevando o país à condição de um dos maiores produtores e exportadores mundiais (Gomes, 2001). Aproximadamente 49% da área plantada em grãos no Brasil correspondem à produção de soja (Fig. 1). Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a indústria nacional processa, por ano, cerca de 81,5 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico (Brasil, 2013a). Nosso país é o segundo maior produtor de soja do mundo, com destaque para o Estado de Mato Grosso (Fig. 1). O levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), diz que este ano, o Brasil deve bater mais um recorde de produção na safra 2013/14, ultrapassando os Estados Unidos, a estimativa é que a safra alcance 90 milhões de toneladas (Brasil, 2014b).

A soja é uma excelente fonte de proteínas de alta qualidade, gorduras poli-insaturadas, vitaminas, minerais e outros nutrientes, tanto para a alimentação humana quanto para animal (Krishnan, 2000, Torun, 1992 e Wang *et al.*, 2003).

Há milênios os chineses já conhecem o potencial da soja para uso na alimentação, mas somente nos últimos anos, os ocidentais passaram a considerar a soja como alimento funcional que, por definição, além das funções nutricionais básicas, produz efeitos benéficos à saúde (Brasil, 2014a).



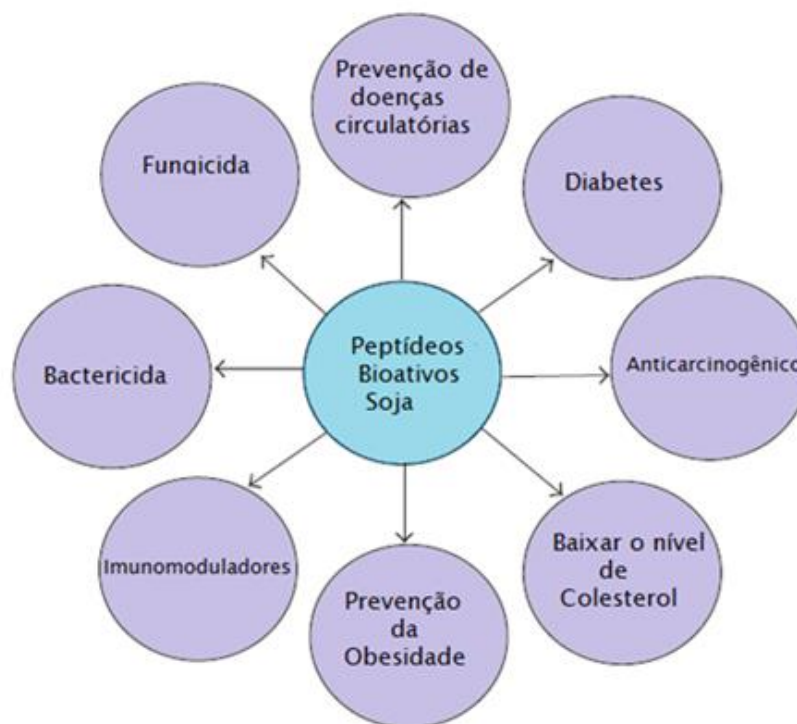
**Figura 1.** Mapa da produção agrícola da soja (Brasil, 2014b)

Devido ao seu alto teor lipídico, este grão é classificado como uma oleaginosa e, portanto, tem sido amplamente empregado como fonte de proteína e de óleo em todo mundo. Maior parte da soja plantada é utilizada para extração de óleo combustível ou para alimentação, gerando o farelo de soja que é utilizado principalmente para produção de ração animal (Liu, 1997).

Em média, a soja contém cerca de 40% de proteínas (Nielsen, 1996). A composição de aminoácidos das proteínas da soja é similar às de origem animal. Sendo assim, a soja é muitas vezes utilizada como substituinte a



proteína animal (Banaskiewicz, 2011). A importância nutricional da soja é também atribuída à presença de peptídeos bioativos. Estas moléculas podem beneficiar a saúde em vários aspectos, como na prevenção de doenças circulatórias, diabetes, proteção contra o câncer, baixar o nível de colesterol no plasma, na prevenção da obesidade, estimula funções imunomoduladoras e atua como antimicrobiano contra microrganismos patogênicos (Wang & Mcjia, 2005) (Figura 2). Além das proteínas, a soja apresenta vários outros componentes funcionais que podem contribuir igualmente em benefício à saúde humana (Tabela 1) (Sugano, 2006).



**Figura 2.** Representação das propriedades dos peptídeos bioativos da soja.

**Tabela 1.** Componentes funcionais da soja e seu efeito

<b>Componentes</b>	<b>Efeitos Benéficos</b>
ácido $\alpha$ -linolênico	Ácido graxo essencial, efeito hipotriglicérmica e melhora a função cardíaca. coração.
Isoflavonas	Estrogênicas, hipocolesterolêmicas, melhora a função do trato digestivo, ajuda a prevenir o câncer de mama, de próstata e de colón, ajuda na saúde óssea e melhora o metabolismo lipídico.
Lecitinas	Ativa o metabolismo lipídico, a memória e as habilidades de aprendizagem.
Lectinas	Efeito anticancerígeno e imunostimulador.
Ácido Linoleico	Ácido graxo essencial, efeito hipocolesterolêmico
Peptídeos	Facilmente absorvíveis, reduzem a gordura corporal e tem efeito anticarcinogênico.
Fitosteróis	Efeito hipocolesterolêmico e prevenção do o câncer de próstata.
Proteínas	Efeitos hipocolesterolêmico, anticarcinogênico e reduz a gordura corporal.
Saponinas	Regulam o metabolismo lipídico e tem ação antioxidante.

(Adaptado de Sugano, 2006)

## **1.2. Composição da soja**

### **Proteínas**

Em média a soja contém aproximadamente 40% de proteínas, das quais, 90% é composta por duas globulinas de armazenamento, 11S glicinina e 7S  $\beta$ -conglucina (Liu, 1997). Estas proteínas da soja fornecem todos os aminoácidos essenciais para a nutrição humana sendo compatíveis às proteínas de origem animal, mas, estão associadas a menos gordura saturada

e sem colesterol. Muitas das proteínas da soja são bioativas como, a hemaglutinina, os inibidores de tripsina, a  $\alpha$ -amilase e as lipoxigenases (Liu., 1997).

### **Óleo**

A soja contém aproximadamente 19% de óleo sendo que os triglicerídeos são os componentes principais. Os triglicerídeos de soja são caracterizados por quantidades relativamente grandes de ácidos graxos poliinsaturados, contendo aproximadamente 55% de ácido linoléico e aproximadamente 8% de ácidos  $\alpha$ -linolénico (Messina, 1997). O ácido linoleico do óleo de soja é um ácido graxo essencial, pertencente à família  $\omega$ -6, o qual exerce funções nutricionais e fisiológicas importantes. O ácido  $\alpha$ -linolénico pertence à família do  $\omega$ -3 de ácidos graxos, e auxilia na regulação de uma série de vias metabólicas. No entanto, devido à presença de lipoxigenases na soja, o ácido linolênico torna o óleo de soja propenso a rancificação (Liu, 1997). Os componentes secundários do óleo de soja bruto são fosfolipídios, coletivamente chamados de lecitina, fitoesteróis e tocoferóis.

### **Carboidratos**

A soja contém aproximadamente 35% de carboidratos, sendo a maioria deles polissacarídeos não-amiláceos e compostos principalmente de fibra dietética insolúvel. Além do uso como um suplemento de fibra dietética, os polissacarídeos têm sido utilizados para modificar as propriedades físicas de uma variedade de alimentos (Espinosa-Martos & Ruperez, 2006).

### **Vitaminas e Minerais**

A soja é a melhor fonte de vitaminas do complexo B (Liu, 1997) em relação aos outros cereais, porém, carece de vitaminas B12 e C. O óleo de soja também contém  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -tocoferol e traços de  $\delta$ -tocoferol (Liu, 1997; Sugano, 2006), que são excelentes antioxidantes naturais. Os minerais estão presentes em pequenas quantidades (Sugano, 2006), dentre os quais se destacam os elementos K, P, Ca, Mg, Fe e também soy-ferritina (Ajay *et al.*, 2011).

### **Isoflavonas**

A soja é a fonte mais abundante de isoflavonas (aproximadamente 3 mg/g de peso seco) na natureza (Kudou *et al.*, 1991). As isoflavonas são estruturalmente semelhantes ao estradiol de mamíferos e pode se ligar às isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  do receptor de estrogênio, por essa razão sendo denominados fitoestrogênios. No entanto, apesar de terem efeito benéfico à saúde, as isoflavonas não são consideradas nutrientes essenciais da dieta humana (Ajay *et al.*, 2011).

### **Ferritina**

A soja contém ferritina, uma proteína de armazenamento de ferro multimérico. Este ferro apresenta uma boa biodisponibilidade no organismo humano sendo, portanto, bem absorvido (Lonnerdal, 2009). Por esta razão, a incorporação de soja na dieta humana, de pessoas que sofrem de anemia, é recomendada (Ajay *et al.*, 2011).

A soja é raramente consumida cozinhando-se os grãos. A utilização da soja na dieta humana ocorre, tradicionalmente, pelo processamento dos grãos, gerando os alimentos à base de soja ou ingredientes para a indústria de alimentos (Snyder & Wilson, 2003).

Segundo Ribeiro *et al* (2007), a soja apresenta como características positivas a facilidade no transporte e no preparo para consumo, a longa durabilidade e a variedade de subprodutos, o que de certa forma, explica a sua grande aceitação e utilização no mercado internacional.

Para a produção de óleo, a soja passa por um processo de prensagem e/ou por extração com solvente orgânico gerando, ao final do processo, um resíduo sólido (farelo de soja) rico em proteínas. Este resíduo, na maioria das vezes é reaproveitado para fabricação de ração animal, depois de passar por tratamento térmico seguido de tostagem para inibição dos fatores antinutricionais (Snyder & Wilson, 2003). Os fatores antinutricionais termolábeis encontrados, são os inibidores de proteases, lectinas, hemaglutininas, fatores bociogênicos, antivitaminicos e antiminerais (fitatos) (Miura *et al.*, 2001).

### 1.3. Resíduos agroindustriais e produção do farelo de soja

Resíduos agroindustriais são gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas ou produtos de origem animal. Aqueles derivados de atividades agrícolas são constituídos de partes vegetais como palha, caule, talo, folhas, semente, polpa de frutas, legumes e cereais, como ocorre no arroz, trigo, milho, sorgo e cevada. Esses resíduos são gerados em grandes quantidades ao longo do ano compondo os recursos renováveis mais abundantes na terra. A composição química dos resíduos inclui compostos de interesse industrial, principalmente açúcares, fibras, proteínas e sais minerais. Do ponto de vista econômico e ambiental, os resíduos agroindustriais representam um produto de grande interesse uma vez que são baratos e renováveis. A reutilização destes compostos para a produção de novos produtos alimentícios, como a ração animal, contribui para redução dos custos de produção (Zortéa, 2012, Mussatto, 2012).

O complexo de soja é uma das maiores cadeias agroindustriais do Brasil, seu principal destino é o processamento do grão em óleo e proteína. Do grão esmagado, aproximadamente 80% é convertido em farelo (resíduo agroindustrial da soja) e o restante em óleo (Souza *et al.*, 2010). Segundo a Portaria nº 795 de 15/12/93 D. O. U. 29/12/93, o farelo de soja é definido como um produto resultante da extração do óleo dos grãos de soja (*Glicine max* (L) Merrill), por processo mecânico e/ou químico. O farelo é o insumo fundamental para a criação de aves e suínos, e o óleo tem ampla utilização na indústria alimentícia e na produção de biodiesel. A ampla utilização da técnica de esmagamento da soja tem provocado um vínculo crescente entre a indústria, a agricultura e a pecuária (Souza *et al.*, 2010).

O processamento da soja inicia-se com o recebimento dos grãos de soja que passam pelo processo de tostagem e remoção do óleo com solvente, no processamento assegura também que os aminoácidos essenciais não sejam inativados pela ligação com compostos fibrosos. A soja sem casca é condicionada e laminada para a obtenção dos flocos com gordura. O processamento pode se dar por extração com solvente orgânico, para uma

melhor extração. A temperatura de 105 a 120 °C melhora a percolação e a drenagem do solvente nos flocos. O óleo é extraído com solventes (hexano 65-70°C), para obtenção de um farelo sem gordura, que logo passa por uma etapa para remoção do solvente à 105-110°C de 15 à 30 minutos. O material é seco e novamente esfriado à -10°C e moído. (Figura 3).

O farelo é a fonte de proteína mais importante usada para alimentação animal. Seu teor proteico pode exceder em mais de 10% ao dos grãos da soja (Tabela 2). Ela representa dois terços do total mundial de alimentos proteicos (Oil World, 2010), e o seu valor alimentar é insuperável por qualquer outra fonte de proteína vegetal e é o padrão de comparação para outras fontes de proteína (Cromwell, 1999).

De acordo com o teor de proteína e óleo do farelo, este pode ser classificado como farelo "*high-protein*" de soja com 49-50% de proteína + óleo e 3% de fibra bruta, obtido das sementes descascadas, ou farelo "low protein" de soja, com 44 – 46% de proteína + óleo e 6-7% de fibra bruta, obtido das sementes com casca. No farelo da soja, obtido por extração com solvente orgânico, o teor de óleo é tipicamente inferior a 2%, enquanto que em farelos obtidos por esmagamento, este valor excede 3% (Feedipedia, 2014).

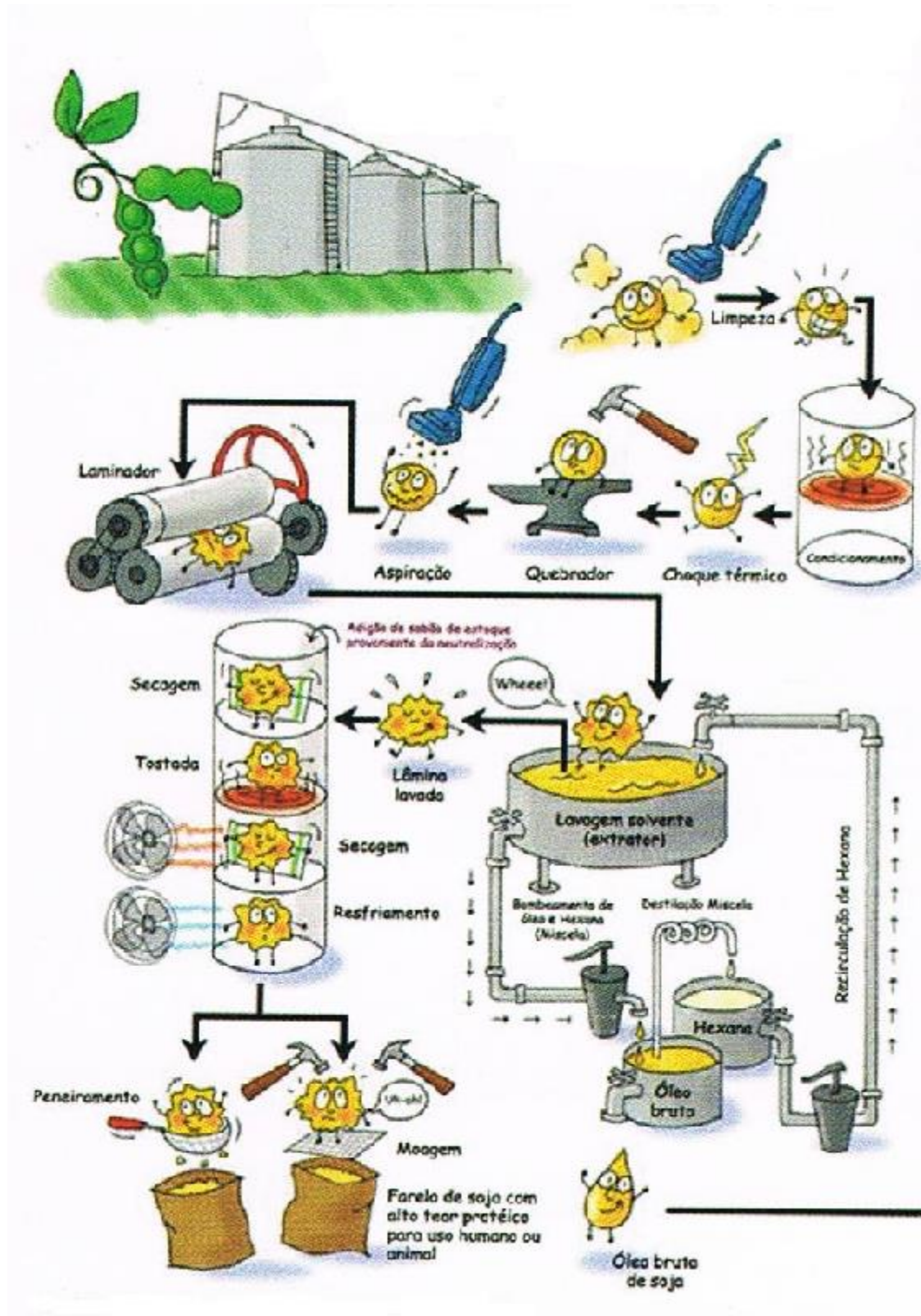


Figura 3. Etapas de processamento da soja. (BSBIOS, 2014)

**Tabela 2.** Tabela de comparação dos componentes do grão e do farelo da soja.

Composição	Grão de soja %	Farelo de soja %
Proteína bruta	39,8	53,8
Fibra bruta	6,3	6,7
Total de açúcares	8,7	9,4
Minerais		
Cálcio	0,013	0,011
Fósforo	0,025	0,023
Potássio	0,074	0,077
Sódio	0,0	0,0
Magnésio	0,010	0,010
Manganês	0,120	0,123
Zinco	0,178	0,176
Cobre	0,08	0,055
Ferro	0,501	0,52
Aminoácidos		
Alanina	4,2	4,4
Arginina	7,2	7,4
Ácido aspártico	11,1	11,3
Cisteína	1,5	1,5
Ácido glutâmico	17,9	17,7
Glicina	4,2	4,2
Histidina	2,7	2,6
Isoleucina	4,5	4,6
Leucina	7,5	7,5
Lisina	6,2	6,1
Metionina	1,4	1,4
Fenilalanina	5,0	5,0



Prolina	5,0	4,9
Serina	4,9	5,0
Treonina	3,9	3,9
Triptofano	1,3	1,3
Tirosina	3,6	3,5
Valina	4,7	4,8
Lipídio	19	0,5

(Adaptado de Feedipedia, 2014)

Dentre as sementes de leguminosas, a semente de soja é a que possui a melhor composição em aminoácidos (Banaszkiewicz, 2011). Neste sentido, é interessante notar que, mesmo após todo o processamento, o farelo de soja ainda retém grande parte dos seus componentes incluindo os compostos bioativos (Tabela 2). Com o conhecimento das atividades fisiológicas dos compostos bioativos, o interesse comercial para o uso em alimentos e medicamentos tem se intensificado juntamente com o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção em escala industrial (Korhonen *et al.*, 1998). Além disto, o farelo de soja representa uma fonte mais barata e prontamente disponível.

#### 1.4. Peptídeos Bioativos de Alimentos

Inúmeras definições foram dadas para peptídeos bioativos e um dos mais apropriados denomina estas moléculas como componentes de alimentos que podem exercer uma atividade de regulação no organismo humano, independentemente das suas funções nutritivas (Meisel 2001).

As crescentes descobertas sobre peptídeos bioativos revelou que muitas proteínas e peptídeos provenientes de alimentos apresentam além do seu valor nutricional já estabelecido, atividades biológicas interessantes (Mine & Shahidi 2006 ; Hartmann & Meisel 2007 ; Tripathi & Vashishtha 2006 ; Yalcin, 2006 ; Möller *et al.*, 2008 ).

Peptídeos bioativos derivados de alimentos geralmente contêm de 2 a 9 aminoácidos (Kitts & Weiler, 2003). No entanto, o número de resíduos de aminoácidos pode variar de 20 ou mais (Korhonen & Pihlanto, 2003). Um exemplo é a lunasina, um peptídeo derivado de soja e cevada com atividade anticancerígena, contém 43 aminoácidos com massa molecular de 5,4 kDa (Jeong *et al.* 2002).

O potencial terapêutico dos alimentos funcionais é atribuído à presença de grupos funcionais específicos e pelos fragmentos peptídicos derivados destas moléculas que são gerados durante o metabolismo dos alimentos (Agyei *et al.*, 2011). Peptídeos bioativos podem ser encontrados em hidrolisados proteicos e produtos lácteos fermentados, mas também podem ser liberados durante o processo de digestão das proteínas de diferentes fontes alimentares (Meisel 2005 ; Korhonen & Pihlanto 2007; Hartmann & Meisel 2007).

Portanto, compostos bioativos de origem alimentar podem ser obtidos de alimentos convencionais, suplementos alimentares, alimentos funcionais ou alimentos medicinais (Agyei *et al.*, 2011). Muitas destas moléculas possuem propriedades antioxidante, antimicrobiana, citomoduladora, imunomoduladora e efeito anti-hipertensivo (Hartmann & Meisel, 2007; Yang *et al.*, 2009).

Os peptídeos antimicrobianos constituem uma classe especial e promissora de moléculas que poderão substituir os antibióticos atualmente em uso e poderão contribuir para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (De Lucca, 2000; Hancock, 2000; Selitrennikoff, 2001).

### **1.5. Peptídeos Antimicrobianos**

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas essenciais no sistema de defesa dos seres humanos, animais e plantas, sendo considerados como parte da primeira linha de defesa (Thevissen *et al.*, 2003, Cole & Ganz, 2000, Zaiou & Gallo, 2002). De fato, estes peptídeos exibem atividade contra fitopatógenos e também contra microrganismos patogênicos para os seres humanos, incluindo os vírus, bactérias, protozoários e fungos (Grossi-de-Sá *et*

*al.*, 2011). Eles podem ser prontamente sintetizados de uma maneira flexível e com um baixo consumo de energia e de biomassa, em função do seu pequeno tamanho (Broekaert *et al.*, 1995). Muitos são sintetizados ou ativados por proteólise a partir de proteínas específicas (Borregaard *et al.*, 2000).

O primeiro PAM relatado em um organismo eucarionte, foi o  $\alpha$ -purotionina do trigo, descoberto em 1942. Ao longo das últimas décadas, muito mais desses peptídeos têm sido extraídos de diversos tecidos de plantas, incluindo raízes, folhas, sementes e flores (Tavares *et al.*, 2008, Sels *et al.*, 2008).

Os PAMs apresentam um amplo espectro de ação contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, envelopes virais (Thevissen *et al.*, 1996) e parasitas (Lofgren *et al.*, 2008). Além da propriedade antimicrobiana, alguns PAMs têm apresentado atividades anticancerígenas e de cicatrização de feridas (Hancock *et al.*, 2003). Como os PAMs diferem estruturalmente dos antibióticos convencionais produzidos por bactérias e fungos, eles representam um novo modelo para o desenvolvimento de drogas efetivas contra os patógenos resistentes a estes antibióticos convencionais (Muñoz *et al.*, 2007).

Os mecanismos de ação destes peptídeos antimicrobianos são variados, incluindo a formação de canais e poros de membrana, a destruição de ribossomos celulares, a inibição da síntese de DNA e a inibição do ciclo celular. Todavia, para muitos dos peptídeos não são conhecidos os mecanismos de ação necessitando de estudos mais detalhados (Selitrennikoff, 2001).

Alternativamente, peptídeos catiônicos e aniônicos, expressos em muitos vertebrados, invertebrados e espécies bacterianas, podem agir sinergicamente para melhorar as respostas imunes (Lüders *et al.* 2003).

A maioria dos PAMs são moléculas catiônicas. Os PAMs catiônicos apresentam em sua maioria, baixa massa molecular, sendo constituídos de menos de 100 resíduos de aminoácidos e com predominância de aminoácidos básicos, que lhes conferem uma carga líquida positiva (+2 a +9), em pH fisiológico. Além disso, os PAMs catiônicos também apresentam uma região

rica em aminoácidos hidrofóbicos. A separação espacial entre os aminoácidos básicos e os hidrofóbicos torna os PAMs catiônicos moléculas anfipáticas (Bulet & Stocklin, 2005).

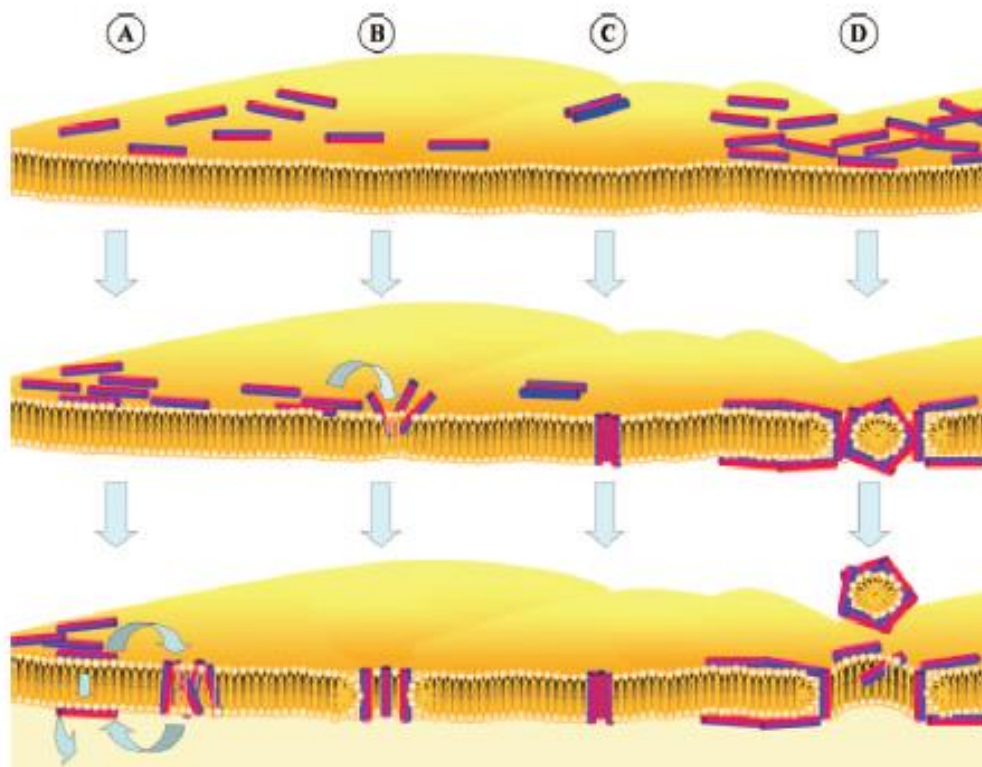
Os PAMs catiônicos geralmente tem como mecanismo de ação a interação com a membrana da célula alvo, através dos outros componentes carregados negativamente. Estas interações podem levar a uma variedade de efeitos como, a permeabilização da membrana, despolarização e lise, resultando assim na morte celular (Matsuzaki, 2009; Brogden, 2005). Além disso, uma série de PAMs catiônicos parece ter como alvo, constituintes celulares aniônicos internos, tais como o DNA, RNA, enquanto outros parecem modular indiretamente a atividade antimicrobiana através da interação com outros componentes do sistema imune (Zaio, 2007; Hamill *et al.*, 2008, Hancock, 2004).

A princípio acreditava-se que a permeabilização da membrana celular bacteriana era o único mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos catiônicos. Porém, evidências indicam que alguns peptídeos antimicrobianos exercem os seus efeitos através de modos alternativos de ação ou que eles podem de fato se complexar ou interagir sobre vários alvos na célula bacteriana. Independente do seu modo de ação, a atividade dos peptídeos antimicrobianos depende, na sua grande maioria, da interação com a membrana da célula bacteriana (Hancock & Rozek, 2002).

O primeiro passo nesta interação é a atração inicial entre o peptídeo e a célula alvo, que ocorre através da ligação eletrostática entre o peptídeo catiônico e componentes da membrana celular da bactéria que são carregados negativamente, tal como grupos fosfato, lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas ou ácidos lipoteicóicos presentes nas superfícies de bactérias gram-positivas. No caso de bactérias gram-negativas, os peptídeos inserem-se na estrutura da membrana externa impulsionado por interações hidrofóbicas em um processo denominado absorção auto-promovida. Esse processo pode envolver a pré-dobragem dos peptídeos associando-se à estrutura da membrana, o que leva a uma perturbação estrutural da membrana externa induzindo a permeabilização da mesma e entrada de outros peptídeos.

Os modos de ação de peptídeos antimicrobianos podem ser classificados de acordo com a maneira que eles interagem com a membrana (Patrzykat *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2001). Neste sentido, quatro mecanismos de ação foram propostos (Fig. 4) e cada um deles indica um tipo diferente de interação com a membrana, que pode levar a um dos três tipos de eventos: a formação de um canal transiente devido a formação de micelas, dissolução da membrana ou translocação através da membrana. Como resultado, o peptídeo pode permeabilizar a membrana e/ou se translocar através dela. Estes mecanismos foram definidos como modelo “aggregate”, “toroidal pore”, “barrel-stave” e “carpet”.

No modelo “aggregate”, peptídeos se reorientam para interagir com a membrana como um agregado formado por micelas do tipo peptídeo e lipídeos, mas sem adotar qualquer orientação em especial. O modelo de “toroidal pore” propõe que os peptídeos ficam inseridos perpendicularmente ao plano da bicamada, com a região hidrofóbica do peptídeo associando-se à cabeça dos fosfolipídeos, enquanto que a região hidrofílica associa-se com a parte central dos lipídeos. Neste processo, a membrana também se curva de tal forma que a bicamada fique alinhada com o poro. No modelo “barrel-stave”, os peptídeos inserem-se perpendicularmente ao plano da bicamada, formando aduelas em forma de "barril", com as regiões hidrofílicas dos peptídeos de frente para o lúmen do poro e as regiões hidrofóbicas interagindo com a bicamada lipídica. O modelo “carpet” propõe que os peptídeos se agregam paralelamente à bicamada lipídica, revestindo a área como um carpete. A uma dada tensão dos peptídeos na membrana, resulta em uma atividade de detergente, causando a formação de micelas e poros na membrana (Jenssen *et al.*, 2006).



**Figura 4. Mecanismos de ação de peptídeos antibacterianos.** A membrana bacteriana está representada em amarelo como uma bicamada lipídica e os peptídeos apresentados como cilindros, onde as regiões hidrofílicas estão representadas em vermelho e as regiões hidrofóbicas estão representadas em azul. Os mecanismos de ação estão representados em (A) Modelo “aggregate”. (B) Modelo “toroidal pore”. (C) Modelo “barrel-stave” e (D) Modelo de “carpet” (Adaptado de Jenssen *et al.*, 2006).

Estudos anteriores mostram que há predomínio de PAMs catiônicos, mas os PAMs com predominância de resíduos acíclicos em sua sequência primária também têm sido descritos. Além disso, durante a última década, peptídeos aniônicos (AAMPs) têm sido identificados também em animais vertebrados, invertebrados e plantas, mostrando a importância destas moléculas na imunidade inata (Frederick *et al.*, 2009).

Evidências mostram que as plantas podem compartilhar a mesma estratégia de defesa presente nos animais, sintetizando e/ou secretando PAMs em áreas de contato com microrganismos. Tal como acontece com outros organismos eucarióticos, a grande maioria destes PAMs são catiônicos, porém

cada vez mais, PAMs aniônicos tem sido encontrados em tecidos vegetais (Hammami *et al.*, 2009).

Os peptídeos que são de natureza aniônica tem resíduos de ácidos glutâmico e aspártico em sua composição, como acontece com o peptídeo de anfíbio Maximin-H5 e com o peptídeo Dermcidin derivado do suor de humanos (Lai *et al.*, 2002, Steffen *et al.*, 2006). Peptídeos aniônicos, geralmente, são formados por 5-70 resíduos de aminoácidos com carga líquida de -1 ou -2, embora tenha sido demonstrado que o peptídeo B obtido de boi, denominado “enkelytin”, tem uma carga líquida de -7 ( Harris *et al.*, 2009, Goumon *et al.*, 2000). Ainda que menos comuns, peptídeos aniônicos contendo 300 resíduos de aminoácidos e carga líquida -20 também já foram descritos (Diego-Garcia *et al.*, 2005, Prochazkova *et al.*, 2006).

Os mecanismos de ação dos peptídeos aniônicos ainda não são muito bem descritos. Estas moléculas podem interagir com constituintes da membrana como os carboidratos. Alternativamente, os peptídeos catiônicos podem mediar à interação dos peptídeos aniônicos com a porção negativa da membrana. Dessa forma, os peptídeos aniônicos, ancorados aos catiônicos, são transportados para o meio intracelular sem danificar a estrutura da membrana microbiana (Brogden *et al.*, 1996, Brogden *et al.*, 2003). Dentro da célula, o peptídeo aniônico pode inibir a ação da atividade da ribonuclease, resultando assim na morte da célula (Vandendriessche, 1956, Sela, 1962).

Os PAMs têm despertado o interesse da área clínica e tecnológica, uma vez que eles representam uma ferramenta valiosa a ser utilizada no controle da perda de colheitas e na produção de antibióticos para tratamento de infecções humanas (Grossi-de-Sá *et al.*, 2011). Adicionado a isto, os PAMs podem ser aplicados à indústria alimentar, não só como um conservante de alimentos, mas também como ingredientes de alimentos funcionais para promover a saúde (Fadaei, 2012).

Em relação às plantas, já foi salientado que tem sido identificados e caracterizados muitos peptídeos, como a lunasina. Este peptídeo obtido da soja e cevada tem 43 resíduos de aminoácidos; tioninas que possuem

propriedade anticarcinogênica; ciclotides, uma classe de peptídeos com atividade inseticida apresenta atividade anti-HIV e anticitotóxica (Jeong *et. al*, 2002).



## **2. Justificativa**

Com o crescente aumento na produção e no processamento de soja, há uma grande produção de farelo, que geralmente é utilizado como ração animal. Mesmo após o processamento, o resíduo gerado ainda retém muito dos compostos bioativos da soja. Tendo em vista as importantes propriedades biológicas e possíveis aplicações destes compostos, é importante pensar em um reaproveitamento para tal farelo, aproveitando o subproduto e gerando produtos de maior valor agregado.

Com base no que foi apresentado, este trabalho, pretende extrair peptídeos bioativos do resíduo industrial dos grãos de soja, o farelo da soja, e avaliar sua atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos patogênicos encontrados em alimentos, podendo assim aumentar o tempo de prateleira de alguns produtos que forem combinados com estas moléculas.

### **3. Objetivo**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Extrair e purificar peptídeos bioativos do grão e do farelo de soja industrialmente processada.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver um protocolo de extração de peptídeos e proteínas de baixa massa molecular de modo a preservar as atividades funcionais destes biopeptídeos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de soja obtidos por diferentes métodos para estabelecer o melhor método de extração;
- Fracionar o extrato do farelo da soja por cromatografia de troca iônica e exclusão por tamanho (SEC);
- Testar a atividade antimicrobiana das frações obtidas.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Organismos.**

Sementes e farelo de uma mesma safra e lote, de soja (*Glycine max*) foram gentilmente cedidos por uma indústria brasileira, sendo que o mesmo material foi usado em todos os experimentos realizados. As cepas de referência (*Acinetobacter* genospecies 3, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli*) obtidas do banco de células do LAABBM e da Fiocruz.

### **4.2. Extração de peptídeos.**

Inicialmente foram testados dois protocolos. Um protocolo foi realizado como descrito por Secchi *et. al.* (2013), preparado com água destilada e o outro segundo Galbas *et al.* (2013), feito com etanol 40%.

#### **4.2.1. Extração com etanol 40%**

Os grãos de soja foram triturados em um minitriturador por 5 min. A 50g dessa soja triturada foram adicionados 100mL de n-hexano e incubado com agitação durante 1h a 4°C. Após esta etapa, a mistura foi filtrada com gaze e o material retido foi deixado em temperatura ambiente para que o hexano evaporasse (por aproximadamente 1h).

Dessa soja desengordurada, 20g foram misturadas a um volume de etanol a 40%, correspondendo 7x o volume da amostra. Este material foi homogeneizado durante 1h a 37°C e foi centrifugado a 1880 x g durante 20 min. O sobrenadante foi coletado e o sedimento descartado.

A amostra foi precipitada e concentrada com acetona para remoção do etanol a 40%.

#### **4.2.1.2. Precipitação de proteínas com acetona**

A amostra foi misturada com acetona na proporção de 4:1, foi homogeneizada e incubada por 1h a -20°C. Em seguida, foi centrifugado por 10 min a 15000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi deixado à temperatura ambiente para evaporação da acetona. Posteriormente, o sedimento foi resuspenso com 3mL de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7.0.

#### **4.2.3. Extração aquosa**

Os grãos ou farelo da soja (50 g) foram triturados em um minitriturador por 5 min e homogeneizados em água destilada (150 ml) e incubados em banho a 50° C por 24 h, sob agitação constante. Esta suspensão foi centrifugada a 8000 x g por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi tratado a 90° C por 10 min, sob agitação constante e em seguida, foi filtrado, utilizando uma membrana Millipore de 0,22 µm.

#### **4.3. Determinação do teor de proteína.**

A concentração de proteína dos extratos foi quantificada utilizando método fluorimétrico Qubit® Kit Protein Assay (Invitrogen Life Technologies, EUA), conforme as instruções do fabricante (Molecular Probes, 2013).

#### **4.4. Análise dos extratos e frações por SDS-PAGE.**

O perfil protéico dos extratos obtidos foi analisado em gel de poli-acrilamida 20% em condições desnaturantes (Laemmli, 1970). As bandas peptídicas foram visualizadas por coloração com Coomassie Blue 0,2%, como descrito por Schagger & Jagow (1987). Como padrão de massa molecular, foi utilizado o padrão Ultra Low Range Molecular Weight Marker (Invitrogen Life Technologies, EUA).

#### **4.4.1. Descrição do Sistema de eletroforese utilizado**

As eletroforeses foram realizadas em um sistema vertical Pharmacia Biotech-Electrophoresis Power Supply EPS 300 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). O gel de poliacrilamida foi montado entre duas placas de vidro (10,6cm x 10,1cm), separadas por espaçadores (0,1cm x 1,1cm x 10,6cm) posicionados nos cantos direito e esquerdo. O sistema foi unido por grampos de pressão, sendo a vedação da base feita posicionando-se as placas com os espaçadores contra uma borracha de silicone. Os géis de resolução e de empilhamento foram montados entre as duas placas de vidro. Quando da montagem deste último gel, um pente contendo dez ou quinze poços foi introduzido no topo do gel para formar as raias. Após a polimerização do gel, as amostras foram aplicadas com o auxílio de uma micropipeta.

#### **4.4.2. Gel de Resolução**

O gel de resolução foi feito misturando-se em um erlenmeyer 7mL da solução estoque de acrilamida 30% - bisacrilamida 0,8%; 2,5mL de Tris-HCl-SDS 0,75M pH 8,8; 50 de persulfato de amônio (APS) a 10% e 5 $\mu$ L de TEMED (tetrametil etileno tiamida)., produzindo uma solução com 20% de monômeros de acrilamida. A mistura foi bem homogeneizada, evitando a formação de bolhas de ar e então, cerca de 6mL de gel foram aplicados entre as placas de vidro previamente lavadas, secas e limpas com álcool comercial. Após depositar a solução, esta foi cuidadosamente coberta com água destilada e deixada a polimerizar por aproximadamente 40 min.

#### **4.4.3. Gel de Empilhamento**

Após a polimerização do gel de resolução, a água que o recobria foi cuidadosamente desprezada e a superfície do gel foi seca com papel de filtro. Sobre este gel foi adicionada a solução do gel de empilhamento, composta por 0,5mL da solução estoque de acrilamida 30% - bisacrilamida 0,8%; 2,5mL de Tris-HCl-SDS 0.25M pH 6,8; 1,925mL de água destilada; 75 $\mu$ L de persulfato de amônio (APS) a 10% e 7,5 $\mu$ L de TEMED. O pente foi colocado antes da adição da solução que foi feita até atingir o topo das placas de vidro. e o sistema foi

deixado em repouso por 30 min à temperatura ambiente. Ao final desse período, o pente foi retirado e o interior das raias formadas foi lavado várias vezes com o tampão de corrida (Tris 25mM, glicina 192mM e SDS 3.5mM) diluído 1:5 (v/v) para remoção dos restos de acrilamida não polimerizada.

#### **4.4.4. Preparação das amostras**

As amostras protéicas foram misturadas com tampão de amostra, presente no kit Ultra-low Range Molecular Weight da Sigma, concentrado 2 vezes (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 4% 2-mercaptoethanol, 0.02% Brilliant Blue G, and 24% glycerol) na proporção de 1:1 (v/v). Após a adição de tampão de amostra, as soluções de proteínas foram aquecidas por 2 minutos em banho de água a 65°C e posteriormente estocados a 4°C até a sua utilização. O padrão de peso molecular utilizado foi do mesmo kit do tampão (Ultra-low Range Molecular Weight da Sigma), o qual foi preparado na proporção de 1:1 de água milliQ e tampão de amostra mais 1 µL do padrão.

#### **4.4.5. Condições da eletroforese**

Após a aplicação de 10 µL de cada amostra e 5 µL do padrão de peso molecular, BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen Life Technologies, EUA), o gel foi posicionado na cuba de eletroforese, preenchida com cerca de 950mL de tampão de corrida, diluído cinco vezes, na cuba inferior e cerca de 300mL do mesmo tampão na cuba superior. O sistema foi mantido a temperatura ambiente e as condições usadas para a eletroforese foram 250 V e 60mA mantida constante durante toda a corrida. Nestas condições, a frente de azul de bromofenol demorava cerca de 70 min para atingir o final do gel. Todos os componentes do sistema foram lavados e montados com a utilização de luvas.

#### **4.4.6. Coloração e descoloração do gel**

Ao término da eletroforese, o sistema foi desmontado e o gel, livre das placas de vidro e dos espaçadores, foi imerso em solução de etanol 40% mais 10% ácido acético durante 30 minutos, para fixar as proteínas. Após disso, o

gel foi corado com Coomassie Blue 0,2% (Coomassie™ Brilliant Blue G-250) dissolvido em solução fixadora (etanol 45%, álcool 45%, ácido acético 10%) durante 1h e foi descorado com solução de ácido acético 10% durante 1h, a solução foi trocada de 20 em 20 minutos. Após ser descorado, o gel foi fotografado em sistema de foto-documentação (DNR Bio-Imaging Systems, MiniBis Pro) e armazenado em água destilada à 4°C.

#### **4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.**

Os microrganismos *Acinetobacter* genomospecie 3, *Pseudomonas fluorescens* e *Escherichia coli*, foram cultivados em meio LB (Luria-Bertani BD™), *Staphylococcus* coagulase negativa foi cultivado em BHI (Brain Heart infusion BD™) e *Listeria innocua* e *Aeromonas hydrophila* foram cultivados em meio BHI acrescidos de 3% de NaCl.

##### **4.5.1. Teste de atividade antimicrobiana**

Os microrganismos foram inoculados em seus meios de cultura adequados durante 18h a 37°C. A concentração de células foi determinada por espalhamento de luz a 600nm e foi feito uma diluição seriada (1:10) em solução salina (0,85% de NaCl), até atingir uma concentração de  $10^3$  células/mL. Cem microlitros da suspensão de  $10^3$  células/mL, foi adicionado, na ausência ou na presença de quantidades decrescentes dos extratos (15 mg a 0,25 mg) e incubadas durante 18h a 37°C. Em seguida, as células foram diluídas seriadamente (1:10) em solução salina (0,85% de NaCl) e semeadas em meio LB ou BHI sólido. Após 18 h a 37° C, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas para avaliar a viabilidade das células na ausência e presença dos peptídeos. Para verificar a atividade antimicrobiana, o microrganismo *Acinetobacter* genomospecie 3 foi utilizado como cepa de referência. A atividade foi inicialmente testada com este microrganismo, que serviu como modelo de comparação com as concentrações das amostras contra outros microrganismos.

#### 4.6. Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

Para comparar o perfil proteico dos extratos, eles foram fracionados por técnica de HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão), em sistema semi-preparativo de GPC / SEC com injeção automática. Foi utilizada uma coluna de GPC / SEC PROSEC 300S (300 x 7,5mm) Varian) protegida por uma coluna ProSEC 300s Guard e acoplado a um detector (SPD –M20A, Shimadzu) a 280nm. A separação ocorreu de modo isocrático através da utilização de uma solução de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo NaCl 0,1 M, com um fluxo de 1,0 mL/min a 25 ° C. O volume de injeção foi de 25 µL para ambos os extratos. Os extratos aquosos foram aplicados com uma concentração de 3 mg/mL e o extrato etanólico a 4 mg/ml. As amostras antes de serem analisadas, no sistema, elas foram filtradas com um filtro Millipore de 0,45µm.

#### 4.7. Cromatografia de troca iônica

Um volume de 4mL de extrato bruto foi concentrado e resuspendido em 4mL de tampão fosfato de sódio 50mM pH 7. Este volume contendo 7,1mg/ml de proteína foi aplicado a uma coluna cromatográfica (1,6 x 20 cm) contendo DEAE-Sepharose, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50mM pH 7. Após a aplicação, o extrato foi deixado em contato com a resina da coluna por 18h, e a coluna foi lavada 5 vezes o seu volume com o tampão de equilíbrio. Os peptídeos ligados a coluna, foram eluídos com 0,2M de NaCl dissolvidos no tampão de equilíbrio. Aa coluna foi operada com um fluxo de 1 mL/min, mantido com o uso de uma bomba peristáltica *Pharmacia Biotech Pump P-1*. Frações de 4 mL ou de 2 mL foram coletadas durante a etapa de lavagem e eluição, respectivamente, com um coletor de frações *Model 2110 Fraction Collector* (Bio-Rad Life Science, EUA) . A absorvância a 280nm das frações obtidas nas duas etapas descritas foi determinada espectrofotometricamente a 280 (Beckman DU-640 Spectrophotometer). A coluna foi regenerada com 1M de NaCl dissolvido em tampão de equilíbrio para que a remoção completa das proteínas ainda ligadas à coluna.



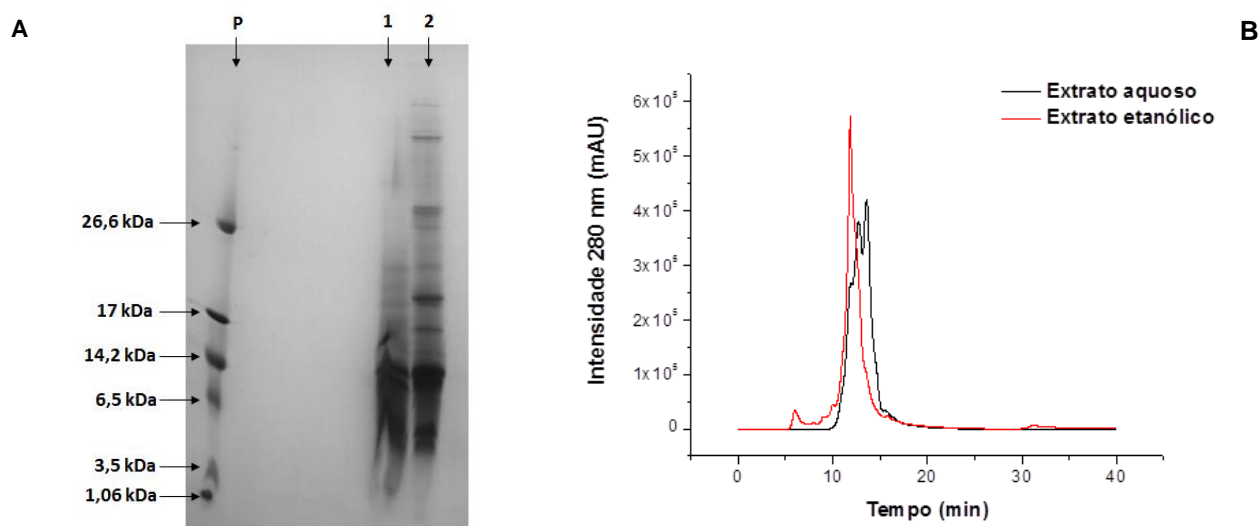
## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Extração de peptídeos.

Como já salientado, foi feita uma tentativa de extrair peptídeos bioativos tanto dos grãos como do farelo da soja, usando tanto a extração aquosa quanto a etanólica.

Inicialmente, foram usados os grãos da soja, e os extratos obtidos foram analisados e comparados por SDS-PAGE e por HPLC (Fig. 5).

Os resultados obtidos mostram que os protocolos utilizados para extrair proteínas de baixa massa molecular do grão de soja mostraram ser adequados para esse propósito, uma vez que grandes quantidades de peptídeos foram extraídos conforme mostrado pela análise em SDS-PAGE (Fig. 5 A). Exceto por apresentar algumas bandas polipeptídicas acima 14,2 kDa (Fig. 5A), a extração com etanol apresentou bandas similares às aquelas presentes no extrato aquoso.



**Figura 5. Fracionamento dos extratos obtidos do grão de soja para análise do perfil de peptídeos por SDS-PAGE e HPLC.** (A) Extrato aquoso (linha 1) e extrato etanólico (linha 2) foram fracionados num gel de poliacrilamida a 20% usando como padrão de massa molecular (linha P) o Ultra-Low Range Molecular Weight Marker (Invitrogen). (B) Ambos os extratos (25  $\mu$ L) foram analisados usando o sistema de GPC / SEC como descrito em Material e métodos.

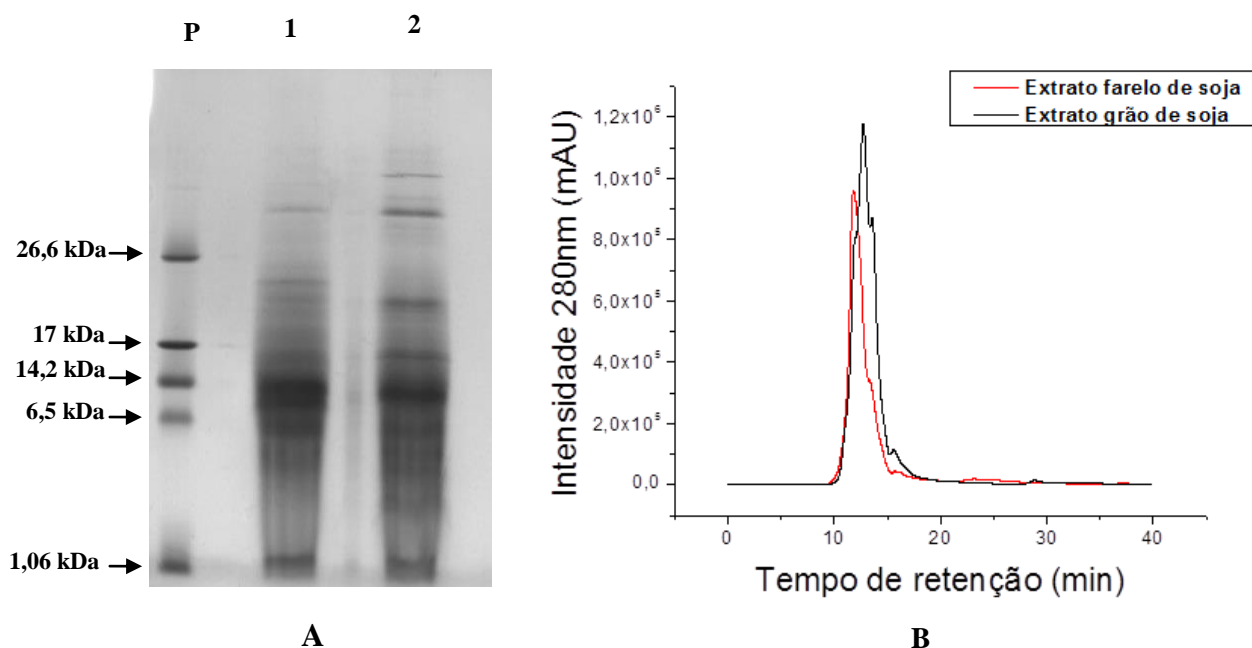
A semelhança no perfil proteico dos extratos foi confirmada por HPLC, que mostrou proteínas majoritárias no tempo de retenção entre 10 e 20 min (Fig. 5B), sendo que as proteínas de baixa massa molecular estavam presentes em ambos os extratos (Fig. 5A). Um pico adicional foi observado apenas no extrato etanólico, no tempo de retenção entre 5 e 10 min (Fig. 5B), o que corresponde a proteínas com massas moleculares acima de 14,2 kDa, tal como mostrado na análise por SDS-PAGE (Fig. 5A).

Proteínas e peptídeos de soja são extraídos, em geral, utilizando água destilada ou tampões Tris ou água contendo sais de fosfato (Amnuaycheewa & Gonzalez, 2010). Neste estudo, a extração foi realizada em solvente aquoso e orgânico, água e etanol, para otimizar extração de peptídeos. Diferente do extrato etanólico, o extrato aquoso foi preparado em condições brandas de temperatura (50° C) seguidas por um tratamento térmico severo (90° C). Tais condições podem desencadear a hidrólise de proteínas da soja pelas proteases naturalmente presentes neste grão, resultando na presença de proteínas de baixa massa molecular e peptídeos, como podem ser vistas na Figura 5A. Segundo Farrokih e colaboradores (2008), em geral os peptídeos envolvidos em sinalização de rotas metabólicas e de ativação de defesa são originados de precursores maiores (polipeptídios), que sofrem proteólise em alguns casos ou sofrem modificações para se tornarem funcionais.

A extração de peptídeos de fontes vegetais ou fontes renováveis tem se intensificado ao longo dos anos, devido à busca por peptídeos com atividades biológicas diversas.

Visto que, a extração com água foi mais eficiente uma vez que foram obtidas em maior número de proteínas de baixa massa molecular e peptídeos e ainda não introduzir a presença de solvente orgânico no extrato, o método também foi aplicado para extrair peptídeos do farelo de soja, visando agregar valor a este subproduto da soja.

Na Figura 6, A e B, pode-se comparar o perfil proteico obtido após a extração aquosa do grão e do farelo de soja.



**Figura 6. Fracionamento dos extratos obtidos do grão e do farelo de soja para análise do perfil de peptídeos em SDS-PAGE e HPLC.** (A) Extrato aquoso farelo (linha 1) e extrato aquoso grão (linha 2) foram fracionados em gel de poliacrilamida a 20% usando como padrão de massa molecular o Ultra-Low (Invitrogen) (linha P). (B) Ambos extratos (25  $\mu$ L) foram analisadas usando o sistema de GPC / SEC como descrito e Material de métodos

Embora a soja industrialmente processada passe por tratamentos térmicos que podem desnaturar e inativar proteínas de interesse para este estudo foi possível extrair peptídeos do farelo de soja aparentemente similares ao do grão. A análise por SDS-PAGE (Fig. 6 A) mostra que os extratos aquosos do grão e do farelo de soja possuem um perfil proteico semelhante. Partes dos peptídeos obtidos identificados poderiam corresponder a peptídeos antimicrobianos, uma vez que estes apresentam massa molecular semelhante a dos com atividade antimicrobianas já que tem massa molecular entre 2 e 9 kDa descritos em plantas (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001).

Em um estudo anterior, Galvez e colaboradores (2010) obtiveram um extrato proteico a partir do farelo de soja preparado com água sob agitação, porém o perfil proteico apresentou um grande número de proteínas com massas molecular superior a 15 kDa, diferente do extrato obtido neste estudo. Galbas e colaboradores (2013), também tentaram obter um extrato proteico

com proteínas de baixa massa molecular fazendo a extração com tampão Tris/HCl 50 mM pH 7.2, mas também obtiveram um extrato onde a maior parte das proteínas apresentou massa molar acima de 20 kDa. Pode-se concluir que o aquecimento utilizado no método desenvolvido no presente estudo, favoreceu o enriquecimento de peptídeos termosresistentes de massas moleculares inferiores a 20 kDa.

## 5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os AMPs, considerados produtos naturais com grande diversidade, representam uma rica fonte de compostos a serem explorados na tentativa de selecionar novos compostos peptídicos de defesa para a agroindústria (Knight *et al.*, 1997) e também na área de alimentos, como agentes conservantes.

Os extratos obtido com água ou etanol foram usados nos testes de atividade antimicrobiana, utilizando como organismos alvo as linhagens de referencia de *Acinetobacter* genomospecies 3, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli*, que são microrganismos patogênicos comumente encontrados em alimentos.

Inicialmente, os dois extratos foram testados contra *Acinetobacter* genomospecie 3, o microrganismo modelo deste estudo. O extrato etanólico não apresentou atividade inibitória sobre o crescimento desta bactéria, mesmo na concentração de 3 mg/mL de proteína. Por outro lado, 0,25mg/mL de proteína do extrato aquoso, tanto do grão como do farelo de soja, foram capazes de inibir completamente o crescimento bacteriano (Tabela 3), sendo esta a concentração mínima inibitória.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana do extrato aquoso e etanólico obtidos de grãos da soja contra *A. genomospecies* 3 (linhagem de referência).

Extrato	Concentração de proteína no ensaio (mg/mL)	Inibição (%)
Extrato aquoso	0.25	100
Extrato etanólico	3.0	0

Os resultados mostraram que a extração com água além de ser eficiente para a extração de peptídeos bioativos (peptídeos que apresentaram atividade antimicrobiana), é um protocolo simples e de baixo custo quando comparado ao custo do solvente orgânico e também para remoção deste do produto final. Dessa forma, optou-se pela extração dos peptídeos com água sob aquecimento.

A atividade antimicrobiana do extrato do farelo preparado com a extração aquosa sob aquecimento também foi testado contra o crescimento das espécies *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Pseudomonas fluorescens* e *Escherichia coli* (Tabela 4), onde foi observado uma inibição total. Da mesma forma, o extrato dos grãos de soja também foi capaz de inibir completamente o crescimento de tais bactérias (tabela 4). Comparativamente, outro estudo (Soares, 2013) relatou que o hidrolisado do extrato proteico do farelo de soja obtido com papaína não apresentou atividade antimicrobiana significativa contra *E. coli* e contra bactérias Gram-negativas. Entretanto, no nosso estudo, o extrato aquoso obtido sob aquecimento apresentou atividade antimicrobiana tanto com bactérias Gram positivas quanto Gram negativas.

**Tabela 4.** Atividade antimicrobiana do extrato aquoso do farelo e grão de soja.

Microorganisms	Farelo de soja (mg/mL)	Grão de soja (mg/mL)	Inibição (%)
<b><u>Gram-positivos</u></b>			
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	1,5	1,5	100
<i>Listeria innocua</i>	3,0	3,0	21
<b><u>Gram-negativos</u></b>			
<i>Escherichia coli</i>	0,7	0,7	100
<i>Acinetobacter genomospecies 3</i>	0,25	0,25	100
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,0	2,0	100
<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	3,0	3,0	100

A transmissão de patógenos de origem alimentar através da produção e comercialização de alimentos, ainda é um problema não solucionado (Gálvez *et al.*, 2010). A contaminação de alimentos é um grave problema de saúde pública, uma vez que pode causar grandes índices de morbidade (Schulz *et al.*, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde, *Escherichia coli* é uma das maiores causadoras de doenças transmitidas por alimentos no Brasil (Brasil, 2013c). A grande maioria dessas amostras de *E. coli* pertence à microbiota intestinal, tanto de seres humanos quanto de animais de sangue quente. No entanto, aproximadamente, 10% destas são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e extra-intestinais (Johnson & Russo, 2005; Kaper, 2004; Russo & Johnson, 2000). Por isso, é de suma importância combater a presença, controlar e evitar a contaminação dos alimentos para eliminar doenças e epidemias, que venham a causar sofrimento e impactam os serviços de saúde.

As espécies de estafilococos coagulase positivas são consideradas patogênicas enquanto as coagulase negativas (ECN) são, em geral consideradas não patogênicas. Contudo, evidências mostraram que algumas espécies de ECN podem ser potencialmente patogênicas para os homens e animais (Balaban & Rasooly, 2001). A produção de enterotoxinas por *Staphylococcus coagulase negativa* tem sido relatada em vários estudos,

sendo a maioria sob condições de laboratório (Valle *et al.*, 1990; Vernozyrozand *et al.*, 1996a; Cheng-Chun & Li-Fen, 1997). Os resultados de alguns desses estudos sugerem que *Staphylococcus* coagulase negativa (Rodriguez *et al.*, 1996; Vernozy-Rozand *et al.*, 1996) podem ser potenciais causadores de intoxicação alimentar, tendo sido relatados três surtos de intoxicação estafilocócica associados com espécies coagulase negativa (Omori & Kato, 1959; Breckinridge & Bergdoll, 1971; Carmo *et al.*, 2002b; Veras *et al.*, 2003).

*Aeromonas hydrophila* é uma bactéria distribuída por várias regiões do mundo e é um agente patogênico na agricultura (Aokii, 1999). Essas bactérias são cosmopolitas e normalmente encontradas no intestino dos peixes, águas e sedimentos de lagos ricos em matéria orgânica (Aoki, 1999, Shama *et al.*, 2000). *A. hydrophila* pode contaminar carnes, vegetais e frutos do mar, causando septicemia e peritonite em humanos (Palumbo, 1996).

A indústria de alimentos vem utilizando diversas medidas durante, o processo produtivo de alimentos para o controle do crescimento microbiano. Dentre as mais utilizadas estão aquelas que modificam as condições para a não proliferação de microrganismos, tais como o decréscimo da atividade de água (Aa), que consiste na desidratação do alimento ou adição de determinados solutos, a refrigeração ou o congelamento, mudanças de pH, adição de conservantes, ou ainda a modificação da atmosfera (Ordóñez *et al.*, 2005).

A utilização de um composto de origem alimentícia que possa ser usado em outros tipos de alimentos como um aditivo natural para combater a proliferação de microrganismos indesejáveis e/ou patogênicos dos alimentos, pode ser uma solução que não altera as características físico-químicas e sensoriais dos alimentos.

Como mencionado anteriormente, as proteínas do extrato aquoso provavelmente estão sofrendo hidrólise durante as etapas de aquecimento. Segundo Adachi e colaboradores (1991), a hidrólise de polipeptídios presentes no extrato de soja pode ser estrategicamente utilizada para produzir peptídeos

bioativos. Possivelmente, o extrato aquoso do grão e farelo de soja aqui descrito, é composto não apenas de peptídeos que estão naturalmente presentes na soja, mas também de peptídeos liberados a partir do processo de hidrólise, acelerado pelo aquecimento durante a extração aquosa.

Produtos naturais, tais como extratos de plantas, seja na forma de compostos purificados ou como extratos brutos, oferecem possibilidades ilimitadas para o controle do crescimento microbiano devido à sua diversidade química (Negi, 2012).

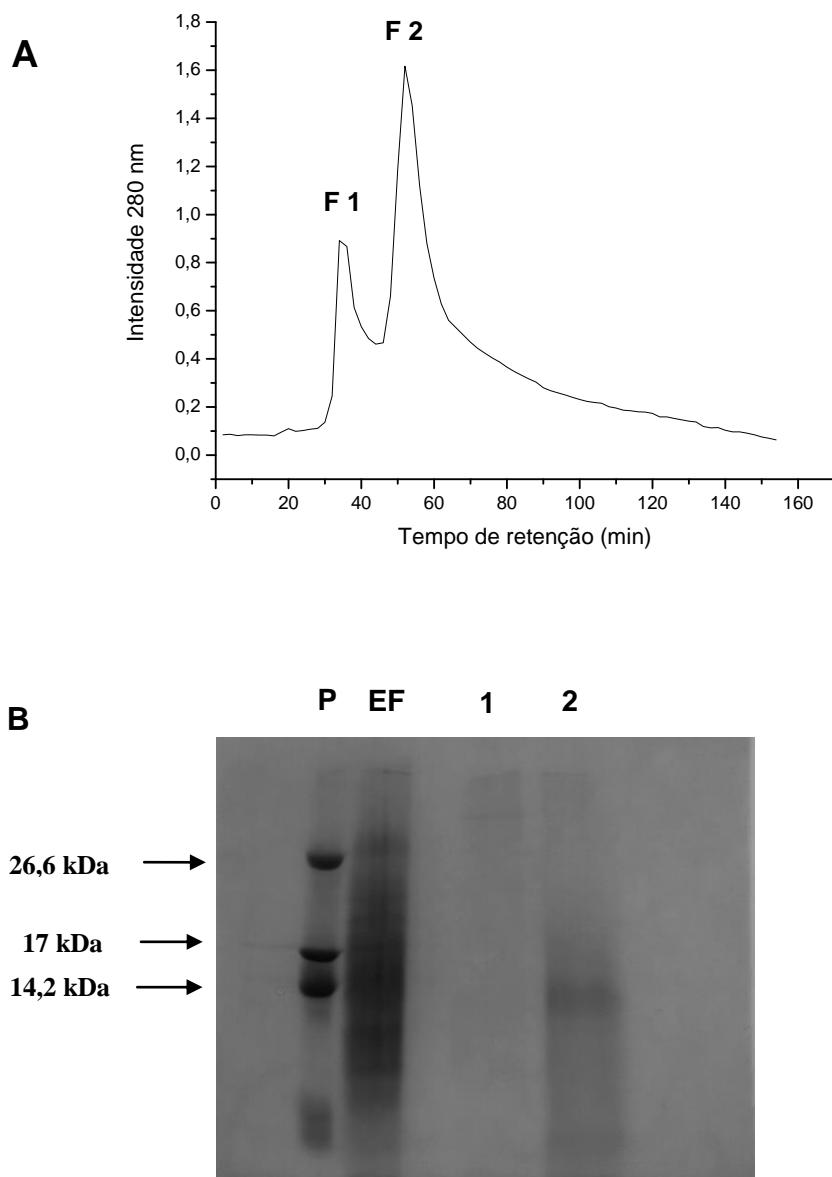
Visto que, o extrato do farelo de soja se mostrou uma potente fonte de peptídeos antimicrobianos, iniciou-se uma purificação parcial deste extrato.

### **5.3. Purificação parcial do extrato do farelo de soja por cromatografia de troca iônica**

O extrato preparado com o farelo da soja foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose, sob baixa pressão, em temperatura ambiente, equilibrada com tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0. A fração proteica catiônica não ligada a coluna, foi eluída com tampão de equilíbrio. As proteínas ligadas à coluna, os peptídeos aniônicos, foram eluídas isocriticamente com o tampão de equilíbrio mais 0,2M de NaCl com um fluxo de 0,75 mL/min.

Duas frações aniônicas, coletadas com tempo de eluição entre 25 e 75 min, foram observadas (Fig. 7A). A análise destas frações por SDS-PAGE 20% revelou a presença de proteínas com massas aparente distintas (Fig. 7B). A fração 1, eluída entre 25 e 45 min, contém proteínas com massa moleculares aparentes superiores a 26 kDa (Fig. 7B). Já a fração 2, eluída entre 45 e 75 min contém, majoritariamente, proteínas com massa moleculares aparentes em torno de 14 kDa (Fig. 7B).





**Figura 7. Fracionamento do extrato do farelo de soja por cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sepharose) e SDS-PAGE 20%.** (A) Frações (F1 e F2) eluídas da coluna de cromatografia de troca iônica na presença de NaCl 0,2M. (B) SDS-PAGE 20% do extrato do farelo da soja (linha EF), fração 1 (linha 1) e fração 2 (linha 2) eluídas da coluna de cromatografia de troca iônica na presença de NaCl 0,2M. O padrão de peso molecular (Ultra-Low range molecular markers - Invitrogen) está representado pela linha P.

A maior parte dos peptídeos antimicrobianos caracterizados descritos na literatura são peptídeos catiônicos, porém, ainda que não frequentemente descritos, existem trabalhos mostrando o potencial antimicrobiano dos

peptídeos aniônicos. Frações obtidas por troca aniônicas, também foram testadas quanto a sua atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos mostraram que ambas as frações, obtidas do extrato aquoso do farelo de soja, são capazes de inibir o crescimento bacteriano da cultura de referência (*Acinetobacter* genomospecies 3) porém, com níveis variáveis (Tabela 5). A fração 1 inibiu 18,2% enquanto que a fração 2 inibiu 57,4% do crescimento *Acinetobacter* genomospecies 3.

**Tabela 5.** Atividade antimicrobiana das frações aniônicas (*Acinetobacter* genomospecies 3)

Frações	Concentração de proteína no ensaio (mg/mL)	Inibição (%)
1	0,1	18,2
2	0,2	57,4
Extrato bruto	0,25	100

Comparando com o extrato bruto, as frações eluídas não apresentaram a mesma eficiência mostrando que parte da atividade foi perdida. No extrato bruto observa-se a presença de peptídeos tanto catiônicos como aniônicos que podem agir sinergicamente potencializando a atividade antimicrobiana final. Os peptídeos catiônicos poderiam mediar a interação dos peptídeos aniônicos com a porção negativa da membrana. Dessa forma, os peptídeos aniônicos, ancorados aos catiônicos, são transportados para o meio intracelular sem danificar a estrutura da membrana microbiana (Brogden *et al.*, 1996, Brogden *et al.*, 2003).

Segundo Negi (2012), os estudos sobre a utilização de agentes antimicrobianos naturais em alimentos vêm crescendo constantemente. Porém, a falta de reprodutibilidade da atividade antimicrobiana destes compostos é um dos principais obstáculos encontrados. Variações qualitativas e quantitativas no conteúdo de fitoquímicos bioativos em extratos vegetais resultam em sua eficácia inconstante. Além disso, a maioria dos estudos utiliza extratos brutos de vegetais, que geralmente contêm outras substâncias interferentes, como

flavonóides na forma glicosídica, onde o açúcar presente neles diminui a eficácia da atividade contra algumas bactérias.

Sendo assim, é importante investir na identificação e purificação dos peptídeos bioativos.

O sequenciamento dos peptídeos com atividade antimicrobiana sejam eles obtidos do grão ou do farelo, aniônicos ou catiônicos, poderão esclarecer se estes foram gerados por proteólise durante o processo de extração ou estão presentes como tal na soja, processada ou não.

## 6. Conclusão

- Validar uma metodologia para extração de peptídeos antimicrobianos do grão e do farelo de soja, com água sob aquecimento, uma técnica simples, barata e efetiva.
- Esses extratos brutos apresentaram atividade antimicrobiana, sendo capazes de inibir completamente o crescimento de *Acinetobacter* genomospecies 3, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase negative* e *Pseudomonas Fluorescens*. E a inibição de *Listeria innocua* foi parcial (21%).
- A purificação parcial do extrato por cromatografia de troca iônica identificou duas frações (fração 1 e fração 2) com atividade antimicrobiana, que foi testada contra a cepa controle (*A. genomospecies* 3) inibindo o crescimento em 18,2% para a fração 1 e 57,4% para a fração 2.

## 7. Perspectivas futuras

- Identificar os peptídeos presentes no extrato aquoso do farelo de soja por Gel Bidimensional;
- Fracionar por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e troca iônica os peptídeos bioativos;
- Testar a atividade antimicrobiana dos peptídeos purificados;
- Identificar os peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana por sequenciamento (Método de Degradação de Edman);
- Determinar se os peptídeos identificados é produto de proteólise ou naturalmente encontrados na soja;
- Testar a citotoxicidade (ensaio colorimétrico com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e atividade antimicrobiana dos complexos peptídeos bioativos-hidroxiapatita em cultura de células humanas (osteoblastos e eritrócitos);
- Testar outras aplicações biomédicas para os peptídeos purificados;
  - ✓ Atividade anticarcinogênica
  - ✓ Atividades antiviral
  - ✓ Atividade antifúngica

## 8. Referências Bibliográfica

AGYEI, D.; APOSTOLOPOULS, V.; DANQUAH, M. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier., v. 23, p. 62-69, 2012.

AJAY K. D., ANTONY J. I. X., NAVIN K. S.; RAKESH K. T. Soybean constituents and their functional benefits. *Research Signpost*; v.37, p.367-383, 2011.

AMNUAYCHEEWA, P.; GONZALEZ, M.; Purification, Characterisation, and quantification of the soy allergen profilin (Gly m 3) in soy products. *Food Chem.*, V. 119, p. 1671-1680, 2010.

AOKI, T.; Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*) Fish Diseases and disorders. *CAB International* ., p.427-476, 1999.

BANASZKIEWICZ T. Nutritional Value of Soybean Meal Siedlce University, Natural Faculty, Poland.; 2011.

BORREGAARD, N.; ELSBACH, P., GANZ, T.; GARRED, P. Innate immunity: from plants to humans. *Immunology Today*, v.21, P. 68-70, 2000.

BRASIL a. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento-soja na alimentação, disponível em [http://www.cnpso.embrapa.br/soja\\_alimentacao/index.php](http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php) Acesso em : 20 Dez. 2014.

BRASIL b. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira, Grãos, safra 2013/2014-quinto levantamento, Brasília. v. 1, n.5, p.1-69, 2014.

BRASIL c. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Doenças transmitidas por alimentos -Informações gerais sobre a doença. Disponível em:<[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idxt=31757](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idxt=31757)>Acesso em: 22 ago. 2013.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A.; OSBORN, R. W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, v.108, p.1353-1358, 1995.

BROGDEN K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, v.3, p.238-250, 2005.

BROGDEN, K.A.; ACKERMANN, M.; MCCRAY, P.B., JR.; TACK, B.F. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents*; v.22, p.465-478, 2003.

BROGDEN, K.A.; DE LUCCA, A.J.; BLAND, J.; ELLIOTT, S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; v.93, p.412–416, 1996.

BSBIOS ENERGIA RENOVÁVEL. Qualidade. Tecnologia Industrial. Processamento de Grão. Disponível em <<http://www.bsbios.com/pages/processamento-de-graos/>> Acesso em: 15 jan. 2014.

BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.*, v. 12, n.1, p.3-11. 2005.

COLE A. M.; GANZ T. Human antimicrobial peptides: analysis and application. *Biotechniques*, v.29, p.822-31, 2000.

CROMWELL, G. L. Soybean Meal - The "Gold Standard". The Farmer's Pride, KPPA News, v.11, p.20, 1999.

DE LUCCA, A.J. Antifungal peptides: potential candidates for the treatment of fungal infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 9, no. 2, p. 273-299, 2000.

DIAZ, P. H; GONZÁLES O. M.; VÉLEZ, Y. R. P.; BÁEZ, C. F. A. G. Aplicaciones de las lectinas. *Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, v. 15, n. 2, p. 91-95 1999.

DIEGO-GARCIA, E.; BATISTA, C.V.; GARCIA-GOMEZ, B.I.; LUCAS, S.; CANDIDO, D.M.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L.D. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* karsch: Genes, peptides and function. *Toxicon*; v.45, p.273–283, 2005.

ESPINOSA-MARTOS, I., RUPEREZ, P. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food. *Nutr. Hosp.*, v. 21, p.92-96, 2006.

FADAEI V. Milk Proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food Ingredients. *Annals of Biological Research*, v. 3, n. 5, p.2520-2526, 2012.

FARROKHI N.; WHITELEGGE J. P; BRUSSLAN J. A. Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnol. J.*, v.6, p.105-134, 2008.

FEEDIPEDIA. Animal feed resources information system. Soybean meal, high protein (dehulled). Disponível em: <<http://www.feedipedia.org/node/674>> Acesso em: 30 jan. 2014.

FREDERICK HARRIS<sup>1</sup>, SARAH R. DENNISON<sup>2</sup> AND DAVID A. Phoenix, Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms, *Current Protein and Peptide Science*, v.10, p.585-606, 2009.

GALBAS M.; PORZUCEK F., WOZNIAK A.; STOMSKI R.; SELWET M. Isolation of low-molecular albumins of 2S fraction from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Biochimica Polonica*, v. 60, n.1, p.107-110, 2013.

GALVEZ A. F. Products and methods using soy peptides to lower total and LDL cholesterol levels. Patent application publication. Pub. No 20100087367, 2010.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current opinion in biotechnology, Elsevier*, v.21, p.142-148. 2010.

GARCIA-OLMEDO F.; RODRIGUEZ-PALENZUELA P.; MOLINA A.; ALAMILLO, J. M.; LÓPEZ-SOLANILLA E.; BERROCAL-LOBO, M.; POZA-CARRIÓN C. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, v.498, p.219-222, 2001.

GARCIA-OLMEDO, F., RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., MOLINA, A., ALAMILLO, J.M, LÓPEZ-SOLANILLA, E., BERROCAL-LOBO, M., POZA-CARRIÓN, C.,. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defense. *FEBS Lett.*; v.498, p.219-222, 2001.

GOUMON, Y.; LUGARDON, K.; GADROY, P.; STRUB, J.M.; WELTERS, I.D.; STEFANO, G.B.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M.H. Processing of proenkephalin-a in bovine chromaffin cells. Identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.38355–38362, 2000.

GRIESHOP C. M.; KADZERE C. T.; CLAPPER G. M.; FLICKINGER E. A.; BAUER L. L.; FRAZIER R. L.; FAHEY G. Effects of Origins of Soybean Meal on Growth Performance, Nutrient Digestibility and Fecal Microflora of Growing Pigs *J. Agric. Food Chem.*,v. 51, 7684-7691, 2003.

GRUBOR, B.; MEYERHOLZ, D.K.; ACKERMANN, M.R. Collectins and cationic antimicrobial peptides of the respiratory epithelia. *Vet. Pathol.*; v. 43, p.595–612, 2006.

HAMILL P.; BROWN, K.; JENSSEN H.; HANCOCK R. E. Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.19, p.628-636, 2008.

HAMMAMI R.; BEN HAMIDA, J.; VERGOTEN, G.; FLISS, I. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids*

HANCOCK R. E. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.*, v.2, p.497-504, 2004.

HANCOCK R. E. Concerns regarding resistance to self-proteins. *Microbiology*, v.149, p.3343, 2003.

HANCOCK, R. E. W., Concerns regarding resistance to self-proteins. *Microbiology*, v.149, p.3343-3349, 2003.

HANCOCK, R. E., A. ROZEK. . Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* v.206, p.143–149, 2002.



HANCOCK, R.E.W. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 9, p. 1723-1729, 2000.

HARRIS, F.; DENNISON, S.R.; PHOENIX, D.A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.*; v.10, p.585–606, 2009.

HARTMANN R , MEISEL H . Food - derived peptides with biological activity: From research to food applications . *Curr Opin Biotechnol*; v.18, n. 2, p. 163 – 169, 2007 .

HORREVORTS A.; BERGMAN K.; KOLLÉE L.; BREUKER I.; TJERNBERG I. L. Investigations of *Acinetobacter* Genomospecies 3 in a Neonatal Intensive Care Unit. *Clinical and Epidemiological Clin. Microbiol.*, v. 33, p.1567, 1995.

JENSSEN H.; HAMILL P.; HANCOCK R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology .*; v.19, n.3, p.491-511, 2006.

JEONG H. J.; LAM Y.; LUMEN B. O. Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *J Agric Food Chem.*, v.50, n.21, p.5903–5908, 2002.

JOHNSON J. R.; RUSSO T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Inter J Med Microb.*, v.295, p.383-404, 2005.

KAO T.; CHEN B. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.54, p.7544-7555, 2006.

KAPER J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.*, v.2, p.123-40, 2004.

KARR-LILIENTHAL L.K. Amino acid, carbohydrate, and fat composition of soybean meals prepared at 55 commercial U.S. soybean processing plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.6, p.2146-2150, 2005.

KITTS D. D.; WEILER K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des.*,v.9, n.16, p.1309–23, 2003.

KORHONEN H , PIHLANTO A . Technological options for the production of health - promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum . *Curr Pharm Des.*; v.13, n.8, p.829 – 843, 2007.

KORHONEN H.; PIHLANTO A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des.*, v. 9, n.16, p.1297–308, 2003.

KRISHNAN, H. B. Biochemistry and molecular biology of soybean seed storage proteins. *Journal of New Seeds*, v.2, p.1–25, 2000.

KUDOU, S., FLEURY, Y., WELTI, D., MAGNOLATO, D., UCHIDA, T., KITAMURA, K., OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric. Biol. Chem.*, v.55, p.2227-2233, 1991.

LAI, R.; LIU, H.; HUI LEE, W.; ZHANG, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad. *Bombina Maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , v.295, p.796–799, 2002.

LIU, K. S. Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In *Soybean Chemistry, Technology, and Utilization*, Chapman & Hall, New York, v.25, p.-113, 1997.

LOFGREN S. E.; MILETTI L. C.; STEINDEL M.; BACHERE E.; BARRACCO M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Exp. Parasitol.*, v.118, p.197-202, 2008.

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins *Am. J. Clin. Nutr.*, v.89, p.1680S-5S, 2009.

LÜDERS, T.; BIRKEMO, G.A.; FIMLAND, G.; NISSENMEYER, J. and NES, I.F. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, n. 3, p. 1797-1799, 2003.

MATSUZAKI K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1788, n.8, p.1687-1692, 2009.

MEISEL H . Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins . *Curr Medical Chemistry*; v.12, p. 1905 –1919, 2005.

MEISEL H. Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 56, p. 83-91, 2001.

MELLO, F. O. L.; SEDIYAMA C. S.; MOREIRA M. A.; REIS M. S.; MASSONI G. A.; PIOVESAN N. D. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 39, n. 5, p. 445-450, 2004.

MESSINA, M. J. Soybean foods: their role in disease prevention and treatment. In *Soybean: Chemistry, Technology, and Utilization*. Chapman and Hall: New York, USA, pp. 442-447, 1997.

MINE Y.; SHAHIDI F. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease* . New York : CRC - Taylor & Francis .

M Ö LLER NP , SCHOLZ - AHRENS KE , ROOS N , SCHREZENMEIR J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr.*; v.47, n.4, p. 171 – 182, 2008.

MIURA, E. MY.; BINOTTI, M. A. R.; CAMARGO, D. S.; MIZUBITI, I. Y.; IDA, E. I. Avaliação biológica de soja com baixas atividades de inibidores de tripsina e ausência do inibidor Kunitz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*,v.51, n.2, p.195-198, 2001.

MUÑOZ A.; LÓPEZ-GARCÍA B.; MARCOS J. F. Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.354, p.172-177, 2007.

MUSSATO S. I.; BALLESTEROS L. F.; MARTINS S.; TEIXEIRA J. A. Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. *Processes, Industrial Waste*, Prof. Kuan-Yeow Show (Ed.), ISBN: 978-953-51-0253-3, InTech, DOI: 10.5772/36310, 2012

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International journal of food microbiology*, v. 156, n. 1, p.7-17, 2012.

NIELSEN N. C. Soybean seed composition. In: Verma, DPS, Shoemaker RC, editors. *Soybean: genetics, molecular biology and biotechnology*. Wallingford, U.K.: CAB International. p 127–63, 1996.

OIL WORLD. Major meals, World summary balances. *Oil World Weekly*, v.55 n.3, 45, 2010.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M.; ÀLVAREZ, L.; SANZ, M.; MINGUILLON, G.; PERALES, L.; CORTECERO, M. *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*. vol. 1. Porto Alegre: Artmed. 2005.

PATRYKAT, A., C. L. FRIEDRICH, L. ZHANG, V. MENDOZA, AND R. E. W. HANCOCK. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.46, p.605–614, 2002.

PROCHAZKOVA, P.; SILEROVA, M.; FELSBURG, J.; JOSKOVA, R.; BESCHIN, A.; DE BAETSELIER, P.; BILEJ, M. Relationship between hemolytic molecules in Eisenia Fetida earthworms. *Dev. Comp. Immunol.*; v.30, p.381–392, 2006. *Res.*, v.37, p.963-968, 2009.

RIBEIRO, C. DE F. A. COTTA, M. K., TONELLO, S. DA C. A., CARVALHO, A. C., PARK, K. J. (2007). Exportação brasileira dos principais produtos do complexo soja, In: XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de pós-graduação da Universidade do Vale do Paraíba, 2007. Disponível em: <[http://www.inicepg.univap.br/inic\\_07/trabalhos/sociais/epg/epg00279\\_01c.pdf](http://www.inicepg.univap.br/inic_07/trabalhos/sociais/epg/epg00279_01c.pdf)> Acesso em 15 mar. 2013.

RUSSO T. A.; JOHNSON J. R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.*; v.181, p.1753-4, 2000.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M.; BONELLI, R.; NUNES, M.; BATISTA, C. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. v.14. 2009.

SCHUTTE, B.C.; MCCRAY, P.B., JR. [Beta]-defensins in lung host defense. *Annu. Rev. Physiol.*; v.64, p.709–748, 2002.

SELA, M. Inhibition of ribonuclease by copolymers of glutamic acid and aromatic amino acids. *J. Biol. Chem.*; v.237, p.418–421, 1962.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins, *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, p.2883-2884, 2001.

SELS J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B.M.; CAMMUE, B.P.; De Bolle, M.F. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*; v. 46, p.941-950, 2008.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA de, R. B.; LEITE, O. de S. M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.26, n.3, p. 571-576, 2006.

SNYDER, HE; WILSON, LA. EM: CABALLERO, B., TRUGO, L. C. E FINGLAS, P. M. (eds.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, Oxford, UK, 2<sup>nd</sup> Ed., v. 9, p. 5383-5389, 2003.

SOARES N. B. Obtenção de hidrolisado proteico de torta de soja e avaliação de sua atividade antimicrobiana. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)- Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SOUZA M. O.; MARQUES D. V.; SOUZA G. S.; MARRA R. O complexo de soja: aspectos descritivos e previsões. *Pesquisa Operacional para o Desenvolvimento*. v.2, n.1, p.1-86, 2010.

STEFFEN, H.; RIEG, S.; WIEDEMANN, I.; KALBACHER, H.; DEEG, M.; SAHL, H.G.; PESCHEL, A.; GOTZ, F.; GARBE, C.; SCHITTEK, B. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.50, p.2608–2620, 2006.

SUGANO, M., Ed., *Soy in Health and Disease Prevention*, CRC Press, FL, USA, 2006.

TAVARES L.S.; SANTOS MDE, O.; VICCINI, L.F.; MOREIRA, J.S.; MILLER, R.N.; FRANCO, O.L. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*, v.29, p.1842-1851, 2008.

THEVISSSEN, K.; FRANÇOIS, I.E.J.A.; TAKEMOTO, J.Y.; FERKET, K.K.A.; MEERT, E.M.K.; CAMMUE, B.P.A. DmAMP1, na antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae* FEMS. *Microbiol Lett*, v.226, p.169-173, 2003.

THEVISSSEN, K.; GHAZI, A.; DE SAMBLANS, G. W.; BROWNLEE, C.; OSBORN, R. W.; BROEKAERT, W. F. Fungal membrane responses induced

by plant defensins and thionins. *Journal Biology Chemistry*, v.271, p.15018-15025, 1996.

TORUN, B.. Soy proteins as amino acid and protein sources for preschool-age children. In F. Steinke, D. H. Waggle, & M. N. Volgarev (Eds.), *New Protein Foods in Human Health: Nutrition, Prevention, and Therapy*. Boca Raton FL: CRC Press (1992). pp. 91–100, 1992.

TRIPATHI V , VASHISHTHA B . Bioactive compounds of colostrum and its application . *Food Reviews Intl.*; v. 22, p. 225 – 244, 2006 .

TRIPATHI V , VASHISHTHA B. Bioactive compounds of colostrum and its application . *Food Reviews Intl.*; v. 22, p. 225 – 244, 2006 .

VAN KEMPEN, T.A.T.G. Regional and processor variation in the ileal digestible amino acid content of soybean meals measured in growing swine. *Journal of Animal Science*, v.80, n.2, p.429-439, 2002.

VANDENDRIESSCHE, L. Inhibitors of ribonuclease activity. *Arch. Biochem. Biophys.*; v.65, p.347–353, 1956.

WANG W.; MCJIA E. G. Soybean Association and the USDA Functional Foods. *Comp Rev FoodSd Food Sate*; v. 4, p. 63–78, 2005.

YALCIN AS . 2006 . Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides . *Curr Pharm Des* v.12, p.1637 – 1643, 2006 .

YALCIN AS . Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides . *Curr Pharm Des.*; v. 12 , p. 1637 – 1643, 2006 .

YANG, R., ZHANG, Z., PEI, X., HAN, X., WANG, J., WANG, L. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice. *Food Chemistry*, v.113, n.2, 464-470, 2009.

ZAIYOU M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J. Mol. Med.*, v.85, p.317-329, 2007.

ZAIYOU M, GALLO RL. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med.*; v.80, p.549-61, 2002.

ZHANG, L., A. ROZEK, AND R. E. HANCOCK. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.* v.276, p.35714-35722, 2001.

ZORTÉA M. E. B. Estratégias de cultivo utilizando resíduos das indústrias processadoras de alimentos e óleo de soja para produção de poli(3-hidroxi-butirato). 2012. 108 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química, área de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2012.

Apêndice A- Trabalhos apresentados em congressos com os resultados  
obtidos no presente trabalho