



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA PATRÍCIA BRITO DARPOSSOLO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MANOPROTEÍNA DE
PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces uvarum*: EFEITO
NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

Londrina
2010

FERNANDA PATRÍCIA BRITO DARPOSSOLO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MANOPROTEÍNA DE
PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces uvarum*: EFEITO
NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

Dissertação apresentada ao programa de
Mestrado e Doutorado em Ciência de
Alimentos da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Raul Jorge Hernan
Castro Gómez

Londrina
2010

FERNANDA PATRÍCIA BRITO DARPOSSOLO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MANOPROTEÍNA DE
PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces uvarum*: EFEITO NA
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

Dissertação apresentada ao programa de
Mestrado e Doutorado em Ciência de
Alimentos da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Suely Mayumi Obara Dói
UEL – Londrina – PR

Londrina, 21 de Maio de 2010.

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo Leonardo, pelo grande amor, apoio e companheirismo, além da grande e fundamental ajuda neste trabalho. Também aos meus pais, Murilo e Maria Cristina, pelos grandes valores ensinados a mim e por estarem sempre presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Raul Jorge Hernan Castro Gómez pela orientação, amizade e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Emerson José Venâncio do departamento de Ciências Patológicas da UEL pela colaboração e sugestões para o trabalho, além da fundamental ajuda na execução.

Ao prof. Phileo do departamento de Ciências Patológicas da UEL pelo auxílio em algumas etapas do trabalho.

À profa. Nilva Aparecida Nicolao Fonseca do Departamento de Zootecnia da UEL pelo carinho e auxílio em algumas etapas deste trabalho.

Ao aluno de pós-graduação Silas do departamento de Ciências Patológicas pela valiosa ajuda no desenvolvimento de algumas etapas deste trabalho.

Às alunas de pós-graduação Rosiane Valeriano e Aparecida Malvezi do departamento de Ciências Patológicas pela grande ajuda em algumas etapas.

À aluna de pós-graduação Elis do laboratório LAPA, departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL, pela ajuda em algumas etapas.

Às minhas grandes amigas Agnes, Isabella e Giselle Naomi do curso de pós-graduação em Ciência de Alimentos da UEL pela ajuda, companheirismo e paciência.

Aos amigos do curso de pós-graduação em Ciência de Alimentos da UEL pelo apoio e incentivo.

Aos colegas, professores e funcionários do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL e todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho.

À cervejaria Fábrica 1 de Londrina/PR, em especial ao funcionário Agnaldo, por ter acreditado em nosso potencial e cedido a matéria prima utilizada neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado.

DARPOSSOLO, Fernanda Patrícia Brito. **Extração e caracterização da manoproteína de parede celular de levedura: efeito na modulação da resposta imune.** 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

RESUMO

Leveduras descartadas como subproduto em processos industriais estão ganhando maior atenção como suplemento nutricional para dietas de consumo humano e animal devido ao seu alto conteúdo de proteína e vitaminas. Podem também ser usadas como matéria prima para a extração de componentes celulares, como a β -Glucana e manoproteína (MP). Esta última, presente na camada mais externa da parede celular, tem papel fundamental na ativação do sistema imune do hospedeiro, além de agir como um efetivo bioemulsificante. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a molécula de MP extraída da parede celular da levedura *Saccharomyces uvarum*, descartada após o processo de produção de cerveja e verificar sua ação como bioemulsificante, cicatrizante e modulador da resposta imune utilizando camundongos. Para isso a levedura passou por um processo de autólise, separação da parede celular para a extração da MP com água à 95 °C durante 9 horas, seguido de precipitação com etanol absoluto. Após esse processo, a molécula foi caracterizada quanto à composição centesimal, tipo de açúcares presentes, peso molecular e composição de aminoácidos da fração protéica. Foram determinadas a atividade emulsificante e a estabilidade física e química da emulsão com a mudança no pH e adição de diferentes concentrações de NaCl. Avaliou-se a atividade cicatrizante da MP observando-se a redução do tamanho das feridas dos testículos em suínos submetidos à castração. Também foi avaliada a produção de anticorpos em camundongos imunizados pela injeção intraperitoneal da molécula em diferentes tratamentos (controle positivo; 1000 μ g de MP; 100 μ g de MP; 100 μ g de MP aplicada 6 horas antes do desafio; e 100 μ g de MP aplicada 24 horas antes do desafio), os quais foram desafiados com hemácia de carneiro, e a quantificação de óxido nítrico (NO) *in vitro* produzido por macrófagos peritoneais e *in vivo* por meio de macrófagos e plasma obtidos de camundongos tratados com MP, dos quais também foram retiradas amostras de sangue para realização de análises hematológicas. A MP apresentou elevados valores de atividade emulsificante, além de ser estável em diferentes pHs e concentrações de NaCl. Também agiu como um efetivo cicatrizante, reduzindo o tamanho das feridas dos animais, embora sem diferir do controle. A produção de anticorpos foi maior em animais tratados com 100 μ g de MP durante ou 24 horas antes do desafio, os quais apresentaram elevados níveis de IgTotais após o primeiro desafio e uma maior produção de anticorpos da classe IgG para todos os tratamentos após o segundo desafio com hemácia de carneiro. Na resposta imune inata, a MP foi capaz de estimular a produção de NO *in vitro*, diferindo do controle apenas quando adicionada na concentração de 100 μ g/mL, embora tenha inibido essa produção quando adicionada juntamente com LPS. Já no experimento *in vivo*, o tratamento com MP elevou o teor de NO apenas quando adicionada juntamente com LPS no ensaio com macrófagos peritoneais, além de reduzir a contagem de plaquetas e hemácias e aumentar no número de reticulócitos e neutrófilos segmentados do sangue.

Palavras-chave: Manoproteína. Leveduras. Resposta imune. Bioemulsificante. Cicatrização.

DARPOSSOLO, Fernanda Patrícia Brito. **Extraction and characterization of yeast cell wall mannoproteins: effect on immune modulation response.** 2010. 92 f. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Yeasts discarded as a byproduct from industrial processes are gaining more attention as a nutritional supplement for food and feed due to its high content of protein and vitamins. They can also be used as raw material for extraction of cellular components, such as β -Glucan and mannoproteins (MP). The MP is present in the outermost layer of the cell wall, which plays a fundamental role in the activation of host immune system and acts also as an effective bioemulsifier. The aim of this study was to characterize the MP molecule extracted from *Saccharomyces uvarum* cell wall (discarded after beer production), verify its bioemulsifier action, its healing capacity and the immune modulation response in mice. The yeast was autolyzed in order to obtain the cell wall from which the MP was extracted using water at 95 °C during 9 hours and then precipitated with absolute ethanol. The MP was chemically analyzed (protein, lipids, carbohydrates and ashes content) and characterized the type of sugars present, molecular weight of the protein and there amino acid composition, as well. Were determined the emulsifying activity and physical and chemical stability of the emulsion at different pH and NaCl concentrations. The healing activity of MP was tested observing the wounds reduction size on pigs testicles after castration. It was analyzed the production of antibodies in mice immunized with intraperitoneal MP (in PBS) injection in different treatments (positive control, 1000 μ g of MP, 100 μ g the MP, 100 μ g of MP applied 6 hours before the challenge, and 100 μ g of MP applied to 24 hours before the challenge), which were challenged with sheep red blood cells, and nitric oxide (NO) quantification production *in vitro* by peritoneal macrophages and *in vivo* by macrophages and plasma obtained from mice treated with MP. Blood samples were also removed for hematological analyzes. The MP had higher values of emulsifying activity, and is stable at different pHs and NaCl concentrations. Also acted as an effective healing, reducing the size of the wounds of animals, although did not differ from control. Antibody production was higher in animals treated with 100 μ g of MP during or 24 hours before the challenge, which showed high levels of IgT after the first challenge and specific IgG antibodies at the end of the experiment. As expected, there was a greater production of IgG antibodies to all treatments after the second challenge with sheep red blood. Regarding the innate immune response, the MP was able to stimulate NO production *in vitro*, differing from the control only when it was added at a concentration of 100 μ g/mL, although it inhibited the production when it was added together with LPS. In the *in vivo* experiment, treatment with MP raised the level of NO only when added together with LPS in the assay with peritoneal macrophages, reduce platelet and red blood cells and increase the number of reticulocytes and segmented neutrophils of the blood.

Palavras-chave: Mannoprotein. Yeasts. Immune response. Bioemulsifier. Healing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura da manoproteína de parede celular de *Saccharomyces* sp. (CORBACHO et al., 2005)20
- Figura 2** – Rendimento do processo de extração a partir do creme de levedura como matéria-prima até a obtenção de manoproteína como produto final, em base seca50
- Figura 3** – Caracterização e quantificação dos açúcares presentes na molécula de manoproteína por cromatografia líquida de alta eficiência (coluna CarboPac PA1 – Dionex; eluente de NaOH 1,4 mmol/L; fluxo de 1,0 mL/min; T, 28 °C)53
- Figura 4** – Perfil eletroforético da manoproteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com Comassie Brilliant Blue54
- Figura 5** – Diferença (OV-MP) entre os valores de estabilidade de emulsões de manoproteína (MP) e ovalbumina (OV) armazenadas durante 30 dias à 4 °C com a adição de diferentes níveis de NaCl60
- Figura 6** – Diferença (OV-MP) entre os valores de estabilidade de emulsões de manoproteína (MP) e ovalbumina (OV) armazenadas durante 30 dias à 4 °C em diferentes pHs61
- Figura 7** – Redução do tamanho da ferida do testículo esquerdo de suínos nos diferentes dias de avaliação (1, 3, 5 e 7) para os tratamentos controle e manoproteína (MP).....64
- Figura 8** – Redução do tamanho da ferida do testículo direito de suínos nos diferentes dias de avaliação (1, 3, 5 e 7) para os tratamentos controle e manoproteína (MP).....65
- Figura 9** – Diferença no título de imunoglobulinas totais (IgTotais), IgM e IgG de camundongos tratados com diferentes níveis de manoproteína produzidos entre os dias 7 e 35 de experimento.....70
- Figura 10** – Teor de óxido nítrico produzido *in vitro* por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com diferentes níveis de manoproteína (MP), com ou sem a adição de LPS.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição centesimal aproximada da manoproteína (MP) em base seca	52
Tabela 2 –	Composição de aminoácidos essenciais e não essenciais da manoproteína extraída da parede celular da levedura de cervejaria <i>Saccharomyces uvarum</i>	55
Tabela 3 –	Atividade emulsificante (AE) da ovalbumina e da manoproteína em diferentes concentrações após 24 horas à temperatura ambiente	57
Tabela 4 –	Efeito do NaCl e diferentes pHs sobre a estabilidade da emulsão (EE) contendo ovalbumina (OV) e manoproteína (MP), e a diferença entre os seus resultados (OV – MP), durante armazenamento de 30 dias à 4 °C.....	59
Tabela 5 –	Médias das feridas nos testículos direito (Td) e esquerdo (Te) obtidas nos diferentes dias de avaliação de acordo com os tratamentos	64
Tabela 6 –	Título de imunoglobulinas totais (IgTotais), IgM e IgG de camundongos que receberam manoproteína em diferentes quantidades pela via intraperitoneal no dia 7 de experimento	67
Tabela 7 –	Título de imunoglobulinas totais (IgTotais), IgM e IgG de camundongo que receberam manoproteína em diferentes quantidades pela via intraperitoneal nos dias 7 e 35 de experimento	68
Tabela 8 –	Peso dos órgãos de camundongos tratados com diferentes níveis de manoproteína pela via intraperitoneal ao final dos 35 dias de experimento	73
Tabela 9 –	Quantificação de óxido nítrico, <i>in vitro</i> , produzido por macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c estimulados por diferentes concentrações de manoproteína (MP) com ou sem a adição de LPS.....	75

Tabela 10 –	Quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais, com ou sem a adição de LPS, e liberados no plasma de camundongos da linhagem BALB/c tratados com manoproteína e PBS (controle)	78
Tabela 11 –	Contagem total de plaquetas, hematócrito, contagem de reticulócitos e contagem total de leucócitos do sangue de camundongos da linhagem BALB/c tratados com manoproteína (MP) e PBS (controle) durante um período experimental de 10 dias	79
Tabela 12 –	Contagem diferencial leucocitária obtida do sangue de camundongos da linhagem BALB/c tratados com manoproteína (MP) e PBS (controle) durante um período experimental de 10 dias	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	APROVEITAMENTO DE LEVEDURAS DESCARTADAS EM PROCESSOS INDUSTRIAIS.....	15
2.2	PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS	17
2.2.1	Processos de Extração dos Componentes Celulares.....	20
2.3	APLICAÇÕES DA MP	22
2.3.1	Propriedades Imunológicas	23
2.3.2	Propriedades Emulsificantes	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	EXTRAÇÃO DA MP	31
4.1.1	Matéria-Prima	31
4.1.2	Autólise e Obtenção da Parede Celular.....	31
4.1.3	Extração da Manoproteína.....	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA MANOPROTEÍNA	32
4.2.1	Composição Centesimal da MP.....	32
4.2.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	33
4.2.2.1	Preparo das amostras	33
4.2.2.2	Condições cromatográficas	33
4.2.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	34
4.2.4	Determinação de Aminoácidos.....	34
4.3	PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DA MP	35
4.3.1	Efeito da Concentração da Manoproteína	35
4.3.2	Efeito do pH.....	36
4.3.3	Efeito do NaCl.....	36
4.4	PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS	37

4.4.1	Atividade Cicatrizante da MP	37
4.4.2	Avaliação in vivo da Resposta Imune Humoral: Experimento Piloto.....	37
4.4.2.1	Análise de hemaglutinação.....	38
4.4.3	Avaliação in vivo da Resposta Imune Humoral.....	39
4.4.4	Quantificação in vitro de Óxido Nítrico (NO) por Macrófagos Peritoneais.....	40
4.4.5	Avaliação in vivo da Resposta Imune Inata	41
4.4.5.1	Quantificação de NO do plasma	42
4.4.5.2	Efeito do tratamento in vivo com MP sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais residentes	43
4.4.5.3	Análise hematológica.....	43
4.4.5.3.1	<i>Contagem total de plaquetas.....</i>	44
4.4.5.3.2	<i>Determinação do volume globular (VG)</i>	44
4.4.5.3.3	<i>Contagem de reticulócitos</i>	45
4.4.5.3.4	<i>Contagem total de leucócitos</i>	45
4.4.5.3.5	<i>Contagem diferencial de leucócitos.....</i>	46
4.4.6	Análise Estatística do Experimento	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1	RENDIMENTO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA MP	48
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA MP EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE SACCHAROMYCES UVARUM.....	51
5.3	PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DA MP	56
5.4	PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS	62
5.4.1	Atividade Cicatrizante da Manoproteína	63
5.4.2	Avaliação da Resposta Imune Humoral.....	67
5.4.3	Quantificação de NO	74
5.4.4	Análise Hematológica	79
6	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são o grupo de microrganismos comercialmente mais explorado e uma das mais importantes ferramentas da biotecnologia no Brasil, sendo utilizadas na elaboração de diversos produtos. Muitas das suas propriedades biológicas apresentam aplicações industriais e são comumente envolvidas com a panificação, produção de bebidas alcoólicas e etanol.

Em alguns processos industriais a levedura atua apenas como um agente biológico de transformação, uma vez que ao término do processo produtivo é descartada como um subproduto. Conseqüentemente, vislumbra-se a necessidade de buscar novas aplicações deste agente biológico após sua utilização em processos primários, a fim de reduzir os impactos ambientais e aumentar o valor agregado deste subproduto, já que são geradas aproximadamente 110 mil toneladas de creme de levedura por ano após o processo de fabricação da cerveja.

Entre as inúmeras possibilidades, seu aproveitamento na alimentação animal e na formulação de produtos para humanos, como complemento nutritivo e flavorizante, têm ganhado importância devido ao seu elevado teor de proteínas e vitaminas. Além disso, diversos estudos têm focado a aplicação das leveduras através do fracionamento das células e o aproveitamento dos componentes da parede celular.

Sua estrutura é composta principalmente pelos polissacarídeos quitina, manana e glicana, sendo esses últimos, as β -glucanas, utilizadas como promotores de crescimento, devido a sua capacidade em ativar não especificamente os componentes humoral e celular do sistema imune do hospedeiro.

Assim como os carboidratos, as manoproteínas da parede celular estão sendo estudadas por desencadear uma resposta através do sistema imune do hospedeiro. Elas fazem parte das camadas mais externas da estrutura celular e são envolvidas em inúmeros tipos de interações com o ambiente extracelular, especialmente por interações com distintos receptores de superfície de diferentes células do sistema imunológico.

Além disso, estudos recentes têm mostrado que esse complexo proteína-polissacarídeo possui características biotecnológicas importantes, como

boa solubilidade, retenção de água e capacidade de estabilizar emulsões óleo em água, agindo como um excelente bioemulsificante.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar a manoproteína (MP) da parede celular da levedura *Saccharomyces uvarum*, presente no resíduo denominado “creme de levedura” produzido no processo de elaboração de cerveja e avaliar suas propriedades emulsificantes e sua ação como moduladora da resposta imune em camundongos e suínos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 APROVEITAMENTO DE LEVEDURAS DESCARTADAS EM PROCESSOS INDUSTRIAIS

Leveduras são fungos unicelulares facilmente manipuláveis, normalmente não patogênicas, capazes de crescer em várias fontes de carbono e de fornecer grande quantidade de biomassa em tempo relativamente pequeno. Compreendem o grupo de microrganismos mais explorados comercialmente, devido ao emprego industrial de muitas de suas propriedades biológicas (BAPTISTA, 2001).

As leveduras são amplamente utilizadas na indústria de panificação e na produção de etanol, vinhos, cervejas e destilados. Sua importância em indústrias de alimentos e bebidas foi bem estabelecida somente em meados de 1860, embora sejam usadas desde a antiguidade na produção de pães, vinhos e cervejas (COSTA, 2008).

Dentre as leveduras destacam-se aquelas do gênero *Saccharomyces* devido ao seu valor industrial e comercial (VILELA et al., 2000a). Anualmente são produzidas 2 milhões de toneladas de leveduras, as quais são destinadas para as indústrias de panificação, tal fato, faz deste microrganismo um dos mais importantes produtos da biotecnologia (BAPTISTA, 2001).

No Brasil, a produção dessa levedura destina-se, principalmente, a três setores industriais importantes: panificação, sucro-alcooleiro e cervejeiro. Nestes processos a levedura atua como agente biológico de transformação e ao final do processo produtivo são gerados grandes volumes de células excedentes, descartados como subproduto. Desta forma, faz-se necessário buscar alternativas para a utilização destes microrganismos excedentes a fim de atenuar os impactos ambientais causados pelo descarte dos mesmos e diminuir os custos de tratamento de resíduo-efluentes da empresa, o que trará benefícios econômicos importantes para a empresa produtora (COSTA, 2008).

As células de levedura excedentes podem ser utilizadas diretamente, quando íntegras, ou serem processadas para obtenção de inúmeros derivados, como o autolizado, extrato de levedura e concentrados protéicos. Na forma inativa, as células são muito utilizadas na alimentação animal como fonte de

proteína e outros nutrientes e em alimentação humana como complemento nutritivo devido, principalmente, ao seu alto conteúdo de proteína e vitaminas do complexo B que faz com que elas sejam um atrativo suplemento natural (SGARBIERI et al., 1999; VILELA et al., 2000a; YAMADA et al., 2003). Por outro lado, a palatabilidade da levedura tem a vantagem de se constituir em um atrativo, além de suas propriedades como aromatizante e realçador de sabor (BAPTISTA, 2001).

Além de apresentar elevado teor de proteínas (30 a 70 %) e vitaminas, os produtos de leveduras também são ricos em minerais, macro e microelementos, como selênio, sódio, fósforo, potássio, cálcio e ferro, sendo estes dois últimos presentes em maior concentração na parede celular (SGARBIERI et al., 1999). Igualmente, de acordo com Sgarbieri et al. (1999), o consumo de levedura de cervejaria ajuda a prevenir estados carenciais de selênio caracterizado por queda de cabelos, retardo no crescimento, deficiências reprodutivas, cardiomiopatias, necrose e degeneração do fígado e pâncreas. Além disso, as leveduras também apresentam grandes quantidades de fibra dietética, as quais estão representadas por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glicanas (PEPPLER, 1970; YAMADA et al., 2003).

Atualmente, há uma forte tendência em explorar comercialmente leveduras, através do isolamento de alguns dos seus principais constituintes celulares como enzimas (invertase, lactase), nucleotídeos, proteínas (manoproteínas), polissacarídeos (glicana, manana, galactana), além de lipídeos, como fosfolipídeos e ergosterol, sendo este último precursor da vitamina D, os quais, quando isolados, apresentam interessantes propriedades tecnológicas e alto valor agregado (VILELA et al., 2000b; FUKUDA et al., 2009).

O valor nutritivo de preparados de células rompidas mecanicamente, bem como de concentrados protéicos de *Saccharomyces* sp., vêm sendo estudado e foi demonstrado que os isolados protéicos apresentam melhor qualidade nutricional comparados às células íntegras devido, principalmente, a estas últimas apresentarem um alto teor de ácidos nucléicos, serem fontes de componentes ativos indesejáveis e ao efeito deletério da parede celular espessa e rígida sobre a biodisponibilidade de nutrientes (VILELA et al., 2000a). Yamada et al. (2003) mostraram menores valores de digestibilidade protéica nas células íntegras, a qual é atribuída à resistência da parede celular à ação das enzimas digestivas, principalmente em animais monogástricos.

A composição de aminoácidos das leveduras é balanceada, destacando-se teores elevados de ácido glutâmico, aspártico, leucina e alanina (SGARBIERI et al., 1999), além da presença de lisina, treonina e triptofano, o que classifica a proteína como de boa qualidade devido à composição em aminoácidos essenciais apresentar-se em quantidades e proporções adequadas, superando os valores recomendados pelo padrão de referência da FAO/WHO (VILELA et al., 2000a; BAPTISTA, 2001; YAMADA et al., 2003). De acordo com Sgarbieri et al. (1999), a presença de triptofano em amostras de levedura é importante pois tornam os produtos de levedura ideais para misturas com cereais, no sentido de complementar esses aminoácidos essenciais que são, normalmente, deficientes nos grãos. O perfil de aminoacídico não evidenciou deficiência em aminoácidos sulfurados totais (metionina mais cisteína), como é comumente citado na literatura, aproximando-se dos valores de referência da FAO/WHO (SGARBIERI et al., 1999; VILELA et al., 2000a).

Testes biológicos com animais demonstraram que as células íntegras e produtos de leveduras atuaram como promotor de crescimento em ratos recém-desmamados e possuem valor nutritivo equivalente a 80-85% do valor encontrado para a caseína (VILELA et al., 2000a). Desta forma, ratos tratados com esses produtos evidenciaram uma tendência de maiores ganhos de peso, acentuada com o aumento da concentração dos derivados de levedura (VILELA et al., 2000b).

Verifica-se assim, que produtos de leveduras vêm sendo pesquisados principalmente como potenciais fontes de macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, as quais representam os mais abundantes compostos orgânicos da biosfera, além de exibirem importantes propriedades e diferentes aplicações tanto na saúde humana como em outras áreas, podendo ser recomendados como parte da dieta humana (VILELA et al., 2000a; FUKUDA et al., 2009).

2.2 PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS

A parede celular é crucial para a integridade das leveduras. Sua rígida estrutura mantém a forma da célula e oferece proteção contra condições

ambientais nocivas, além de modular a entrada seletiva de macromoléculas (CID et al., 1995). É composta principalmente de β -glucanas e manoproteínas, além de uma menor quantidade de quitina e lipídeos, consistindo de 15% a 30% do peso seco da célula (CID et al., 1995; KAPTEYN et al., 1997).

Os polissacarídeos correspondem a aproximadamente 85 a 90% da parede celular das leveduras, as proteínas 10-15% e uma menor quantidade de lipídeos (MARTÍNEZ ET al., 1998; LESAGE; BUSSEY, 2006; LIU et al., 2008). Sendo assim, os três principais grupos de polímeros que formam a parede celular de leveduras são: as manoproteínas, polímeros de manose covalentemente ligados a peptídeos que correspondem a aproximadamente 40% da massa seca da parede celular; β -glucana, polímeros de glicose que corresponde a 60% da massa seca da parede celular; e a quitina, que são formadas por homopolímeros não ramificados de *N*-acetil-D-glicosamina correspondentes a 2% do peso seco da parede celular (MARTÍNEZ et al., 1998; LIU et al., 2008).

As β -glucanas podem ser divididas em dois subtipos de acordo com o modo de ligação entre suas moléculas de glicose. As cadeias longas são relatadas como o componente amorfo da parede celular e formadas por uma rede fibrosa de β -1,3-D-glicose, com aproximadamente 600 nm de comprimento, os quais são compostos por 1500 unidades de glicose. Possuem massa molecular de aproximadamente 240 kDa e representam cerca de 85% do total de β -glucanas de parede celular, sendo a maioria disposta em conformação helicoidal (LIPKE, 1998; LESAGE; BUSSEY, 2006). As cadeias curtas são altamente ramificadas, arranjadas por aproximadamente 150 resíduos de glicose, e compõem cerca de 15% das glicanas estruturais, compostas por unidades de β -1,6-D-glicose (LIU et al., 2008).

O complexo β -1,3-glucana-quitina formam o maior componente do esqueleto interno da parede celular, adjacente à membrana plasmática, responsável pela força mecânica da parede (MARTÍNEZ et al., 1998; KLIS et al., 2002; LESAGE; BUSSEY, 2006). A quitina é o menor, mas um componente estruturalmente importante, particularmente associado com as conexões entre células, na cicatrização e no septo de divisão de células independentes e, juntamente com as glucanas, forma os componentes estruturais da parede celular (MARTÍNEZ et al., 1998). As β -1,6-glucanas são responsáveis pelas ligações entre os componentes internos e externos da parede, sendo esses últimos formados pelas manoproteínas (KAPTEYN et al., 1997; LIPKE; OVALLE, 1998).

Manoproteínas, que formam a elétron-densa e fibrilar camada externa da parede, podem variar consideravelmente entre as espécies (MARTÍNEZ et al., 1998; LESAGE; BUSSEY, 2006) e são responsáveis pela porosidade da parede celular, a qual protege a célula da levedura, limitando a permeabilidade da parede celular, além de contribuir também para a força mecânica da parede quanto à resistência à pressão externa (LIU et al., 2008).

Manoproteínas de leveduras são glicoproteínas e conseqüentemente compostas de proteínas covalentemente ligadas a carboidratos, e estes são compostos principalmente de um polímero de manose (94%) e uma menor quantidade de glicose, os quais possuem importante papel em sua atividade biológica. Essa molécula, também chamada de complexo de fosfomanoproteína ou fosfopeptideomanana, consiste de unidades de manopiranosil com ligações α -1,2-, α -1,3- e α -1,6-, em associação com alguns grupos fosfatos (FREIMUND et al., 2003), os quais resultam em numerosas cargas negativas na superfície da célula (KLIS et al., 2002). Esta porção é responsável pelas propriedades hidrofílicas da parede e pode estar envolvida na retenção de água e proteção ao ressecamento (KLIS et al., 2002).

As manoproteínas podem ser divididas em três classes de acordo com suas ligações à estrutura da parede celular, e classificam-se em: moléculas não-covalentemente ligadas à parede; manoproteínas com ligações dissulfeto a outras proteínas covalentemente ligadas a glucana estrutural da parede celular; e a maioria covalentemente ligadas a polissacarídeos da parede celular, particularmente às glucanas estruturais, através de ligações fosfodiéster (KAPTEYN et al., 1997; MOUKADIRI et al., 1999).

Aquelas consideradas por ter somente um papel estrutural, sendo as mais abundantes macromoléculas da parede celular das leveduras, são compostas de aproximadamente 10% de proteínas e 90 % de carboidratos, intercaladas com uma rede de glucana a fim de formar a camada externa da parede celular de leveduras. As outras classes de manoproteínas possuem função enzimática, contém aproximadamente 30-50% de proteína com o restante de carboidratos, e são localizadas principalmente no espaço periplasmático, entre a membrana plasmática e a parede celular (BARRIGA et al., 1999; LUKONDEH et al., 2003).

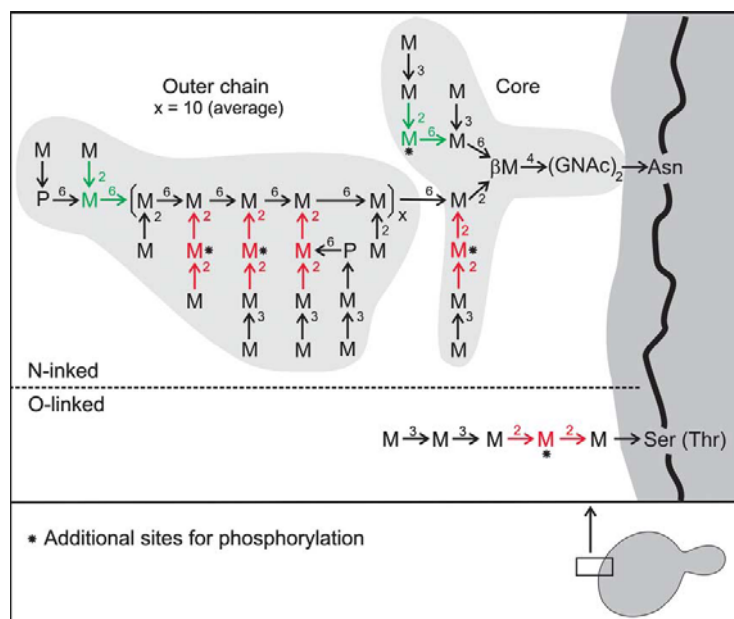


Figura 1 – Estrutura da manoproteína de parede celular de *Saccharomyces* sp. (CORBACHO et al., 2005)

As manoproteínas estruturais de parede celular consistem de uma cadeia central de proteína, na qual dois tipos de cadeias de mananas estão associadas (Figura 1). Um desses polímeros de carboidratos é formado de uma longa, ramificada e volumosa cadeia central de 40 a 100 unidades de manopiranosil com ligações α -1,6, modificado em sua extensão por numerosas ramificações laterais de resíduos de α -1,2 e α -1,3- manopiranosil fosforilados. Esses longos polissacarídeos são incorporados à proteína através de uma ligação N-glicosídica entre uma N-acetilglicosamina e um resíduo de asparagina. O segundo tipo são cadeias curtas de manana, com 1 a 5 unidade de manose, não ramificadas, as quais são incorporadas à proteína por ligações do tipo O-glicosídica à hidroxila das cadeias laterais de serina e treonina (LEHLE, 1980; MARTÍNEZ et al., 1998; BARRIGA et al., 1999; LUKONDEH et al., 2003; LESAGE; BUSSEY, 2006).

2.2.1 Processos de Extração dos Componentes Celulares

Atualmente, há uma forte tendência em explorar comercialmente a biomassa fúngica através do processamento das células e obtenção de extratos, os

quais são obtidos após processos mecânicos ou autólise enzimática, visto que ela constitui uma valiosa fonte de proteínas, lipídeos e principalmente de polissacarídeos que apresentam inúmeras propriedades benéficas para a saúde humana, animal e vegetal (FUKUDA et al., 2009). A parte interna das células são isoladas e, subseqüentemente, alguns dos seus principais constituintes celulares usados como complementos alimentares e intensificadores de sabor devido à alta quantidade de proteínas e nucleotídeos presentes (FREIMUND et al., 2003; YAMADA et al., 2003). A parte externa das células, a parede celular, têm sido muito usado como suplemento para ração animal, embora ela seja a matéria-prima ideal para a extração e obtenção de biopolímeros, como β -glucanas e manoproteínas, os quais exibem importantes propriedades e diferentes aplicações relacionadas com suas características químicas (FREIMUND et al, 2003; FUKUDA et al., 2009).

Em estudos anteriores, inúmeras investigações consistiam no isolamento de alguns desses biopolímeros através da solubilização com soluções de NaOH ou KOH, tampão citrato aquecido e etilenodiamina anidra devido à natureza das ligações químicas desses compostos de interesse (NAKAJIMA, 1974; SUPHANTHARIKA et al., 2003). Em seguida, com a descoberta de ligações alcalina lábeis nessas moléculas sugeriu-se que os materiais isolados de parede celular de levedura por tratamento enzimático indicavam um maior peso molecular do que quando isolados por extrações alcalinas (NAKAJIMA, 1974).

Processos convencionais de isolamento dos componentes externos da parede celular das leveduras envolvem tratamentos ácidos ou alcalinos os quais podem causar certa degradação das cadeias poliméricas, reduzindo o rendimento e enfraquecendo os efeitos benéficos dos componentes celulares (FREIMUND et al., 2003). Por outro lado, tratamentos enzimáticos preservam a estrutura nativa das moléculas, embora estejam limitados pelos custos, sendo viáveis apenas em pequena escala (COSTA, 2008).

Uma das importantes características de mananas isoladas da parede celular de leveduras é sua boa solubilidade em água (KRIŽKOVÁ et al., 2001). Desta forma, um novo processo de extração com água quente foi encontrado como um bom processo para separação de compostos solúveis em água. É um processo não degradativo, sem mudanças de pH à valores extremos, que resulta em altos rendimentos com preservação da estrutura original de glucana e MP separada

como um subproduto, ambos compostos biologicamente ativos de grande interesse (FREIMUND et al., 2003; LIU et al., 2008).

De acordo com Freimund et al. (2003), após processo de extração com água à 125 °C em autoclave e agitação para separação dos compostos solúveis, a MP pode ser separada do sobrenadante através de precipitação com etanol aquoso, obtendo rendimento de 14%. De acordo com Liu et al. (2008), o tratamento com água quente diminui a força mecânica da parede celular da levedura devido à presença das manoproteínas, facilitando a ruptura da parede celular sem degradação das cadeias, e a separação dos componentes de interesse.

Esse novo método, além de ser economicamente viável, é ambientalmente seguro devido à ausência de tratamento ácido ou alcalino no processo de extração, além de ser facilmente reproduzido para um processo industrial de alta escala (LIU et al., 2008).

2.3 APLICAÇÕES DA MP

Os polissacarídeos microbianos têm recebido considerável atenção quanto ao isolamento de seus componentes celulares, tais como manoproteínas de parede celular, pois apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico que devem estar relacionadas com a natureza físico-química e conformação espacial da molécula (FUKUDA et al., 2009).

A MP exerce papel fundamental em vinhos enriquecendo suas propriedades organolépticas devido à interação de suas moléculas com os compostos aromáticos presentes, além de atuar como natural inibidor da cristalização de bitartarato de potássio prevenindo a ocorrência de precipitados, e na redução da visível névoa de proteínas em vinhos brancos (GONÇALVES et al., 2002). Chalier et al. (2007) relataram também outras propriedades da MP em vinhos como o decréscimo da adstringência em vinhos tintos, aumento na estabilidade da cor, inibição da agregação de tanino, e estimulação da fermentação malolática.

É importante também ressaltar que dependendo das características químicas que esses biopolímeros apresentem como, por exemplo, o grau de solubilidade em soluções aquosas, é possível também a sua utilização nos mais

diversos segmentos, como nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos (FUKUDA et al., 2009). De acordo com Rahman (2008), a MP também pode ser classificada como uma molécula biossurfactante, ou seja, compostos biologicamente anfipáticos que agem como detergentes, reduzindo a tensão superficial, os quais são de grande interesse também na área farmacêutica.

2.3.1 Propriedades Imunológicas

Muitos estudos têm sido direcionados com a intenção de conhecer a resposta imune do hospedeiro às doenças infecciosas e descobrir compostos que modulam a resposta biológica de células do sistema imunológico, melhorando a resistência à infecção microbiana. Inúmeras classes desses compostos, como as proteínas, lipopolissacarídeos, glicoproteínas e derivados de lipídeos têm sido caracterizados como moléculas que possuem potentes efeitos no sistema imune do hospedeiro, regulando sua resposta a microrganismos e interagindo de forma a manter o equilíbrio que governa uma resposta adequada aos organismos infecciosos (TZIANABOS, 2000).

Desde 1940 tem-se estudado as aplicações funcionais da β -D-glucana, devido à sua atividade imunomodulatória e habilidade de fazer ligações específicas em receptores de macrófagos, ativando-os e resultando em atividades antitumorais, antibacterianas e antiinflamatórias, além da cicatrização, melhorando a imunidade inata do hospedeiro. Além disso, estudos demonstraram atuar também na diminuição do colesterol (TZIANABOS, 2000; LIU et al., 2008).

Assim como os carboidratos e as proteínas, as glicoproteínas, sendo estas últimas predominantemente manoproteínas, são um dos principais componentes da parede celular de microrganismos que podem desencadear uma potente resposta imune humoral no hospedeiro, através da produção de anticorpos específicos (MARTÍNEZ et al., 1998).

Essas glicoproteínas, presentes nas camadas mais externas da célula, são envolvidas em inúmeros tipos de interações com o ambiente extracelular relacionados à patogenicidade, como a adesão das células a tecidos de mamíferos, podendo estimular respostas imunes mediadas por células (KAPTEYN et al., 1995).

Além de sua contribuição no reconhecimento celular, as mananas de parede celular de leveduras quando isoladas possuem atividade inibitória contra tumores, uma ação adjuvante da resposta imune, e efeitos hematopoiéticos e radioprotetores, além de outras propriedades relacionadas à imunidade (KRIŽKOVÁ et al., 2001; DRÁBIKOVÁ et al., 2009). Križková et al. (2001) mostraram que o efeito antimutagênico de mananas contra a genotoxicidade de ofloxacina e acridina laranja, as quais causam danos ao DNA do cloroplasto de *Euglena gracilis*, é também baseado em suas propriedades antioxidantes, os quais interagem com vários radicais livres e diminuem a indução de mutações pelo seqüestro de espécies reativas de oxigênio (ROS).

De acordo com Casanova et al. (1992), as características químicas e propriedades biológicas de proteínas e glicoproteínas ligadas à parede celular de *Candida albicans* parecem ser dependentes de vários fatores ambientais. Desta forma, moléculas de diferentes tamanhos podem agir como distintos receptores de superfície, interagindo com diferentes células e proteínas do sistema imunológico, além de ter um importante papel na aderência de suas células às células epiteliais do hospedeiro.

Assim, a atividade biológica de manoproteínas de parede celular foi inicialmente descrita devido à patogenicidade de alguns isolados de *C. albicans*. Pacientes com candidíase mostraram elevados níveis de manana circulante e supressão de algumas funções do sistema imune (MENCACCI et al., 1994; TZIANABOS, 2000).

De acordo com Mpofo et al. (2007), mananas desprendidas da parede celular de leveduras ou bactérias podem causar uma defeituosa defesa da mucosa intestinal do hospedeiro. Desta forma, esses polissacarídeos podem atuar sobre fagócitos, inibindo principalmente a liberação de metabólitos reativos de oxigênio e de enzimas por neutrófilos circulantes e monócitos, impedindo a destruição de patógenos através de mecanismos não-oxidativos por macrófagos, levando a um aumento nos níveis de anticorpos circulantes específicos para mananas (MPOFU et al., 2007).

Assim, mananas localizadas na camada externa de microrganismos têm um papel na patogenicidade, induzindo supressão local em funções de fagócitos localizados em tecidos infectados, permitindo a multiplicação desses microrganismos no interior dos fagolisossomos e, ainda, diminuindo a infecção granulomatosa, o

abscesso e a formação de fístula devido à redução do estresse oxidativo (MPOFU et al., 2007).

Alguns microrganismos e produtos derivados da parede celular são associados com doenças específicas, e respostas imunes de hospedeiros a esses componentes têm sido relatados. Recentemente, Ishida-Okawara et al. (2007) examinaram as respostas imediatas obtidas após injeção intraperitoneal de um complexo manoproteína- β -glucana de *C. albicans*, e encontraram ativação de neutrófilos com liberação de superóxidos e sua migração para o sangue periférico, ativação do sistema complemento, liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Além disso, esses polissacarídeos são descritos como moduladores que interferem em funções de macrófagos, como na produção de óxido nítrico (NO). Noleto et al. (2004) avaliaram o efeito de mananas isoladas de leveduras de panificação nas concentrações de 10 - 250 $\mu\text{g/mL}$ sobre macrófagos peritoneais, e os resultados mostraram aumento significativo na produção de NO pelas células em todas as concentrações quando comparadas ao tratamento controle, aonde a solução de menor concentração (10 $\mu\text{g/mL}$) foi suficiente para promover ativação máxima sobre o grupo controle.

Deste modo, os receptores de manose localizados em macrófagos e neutrófilos do hospedeiro reconhecem primeiramente esses carboidratos na superfície de microrganismos, desencadeando a fagocitose (TADA et al., 2002; TORRECILLAS et al., 2007), processo envolvido na ativação de macrófagos e no processamento e apresentação do antígeno. Esses eventos estão ligados à produção de citocinas pró-inflamatórias e na proliferação de linfócitos, sugerindo que ambas as respostas imune inata e adaptativa contribuem extensivamente para a resistência do hospedeiro (MENCACCI et al., 1994; TZIANABOS, 2000; ISHIDA-OKAWARA et al., 2007).

Mencacci et al. (1994) relataram a ativação seletiva de linfócitos T (CD4^+) do sangue periférico em camundongos infectados com *C. albicans*. Desta forma, a atividade imunomoduladora de uma MP de 65-kDa (MP65) foi avaliada em camundongos inoculados com células de *C. albicans*, e os resultados mostraram que a molécula levou à proliferação de células do baço e a elevação dos níveis de IFN- γ produzidos por células T CD4^+ (Th1). Além disso, resultou em um aumento da reação de hipersensibilidade tardia e no tempo médio de sobrevivência dos animais.

Além disso, em animais vacinados com MP65 e desafiados com células de *C. albicans*, foi observada uma melhora na imunidade humoral, com elevação dos níveis de IL-4 produzidos por células T CD4⁺ (Th2) (MENCACCI et al., 1994) e produção de anticorpos (LIBJAKOVÁ et al., 2007). De acordo com Gomez et al. (2000), a MP65 pode ser reconhecida por células mononucleares do sangue periférico de humanos responsáveis pela apresentação de antígenos, os quais levam à indução da linfoproliferação.

Com ação semelhante à MP65, a MP de *Cryptococcus neoformans* com 100kDa de peso molecular induz a uma resposta imune celular de linfócitos Th1 e confere proteção em camundongos frente a um desafio. O efeito dessas manoproteínas requer a presença de receptores de manose em células apresentadoras de antígenos no hospedeiro, como as células dendríticas, as quais estimulam a proliferação de linfócitos e agem na interação entre imunidade inata e adaptativa (HUFFNAGLE; DEEPE, 2003).

Recentes estudos têm mostrado diversas funções importantes atribuídas à mananas de parede celular. De acordo com Díaz-Llano e Smith (2009) a redução na porcentagem de leitões natimortos e o aumento no número de leitões nascidos vivos, quando fêmeas grávidas foram alimentadas com rações contaminadas com micotoxinas de *Fusarium* e adicionadas de uma glicomanana polimérica. Os resultados indicaram que esse polímero pode agir como adsorvente da toxina, reagindo com seus radicais metabólitos tóxicos e diminuindo os níveis de metabólitos tóxicos circulantes nos animais (KOGAN; KOCHER, 2007).

Křižková et al. (2001) também estudaram as mananas de parede celular de *C. albicans*, *Candida utilis* e *Sacharomyces cerevisiae*, e mostraram que elas desempenham papel no controle do estresse oxidativo desencadeado por radicais livres, os quais estão envolvidos no envelhecimento, em doenças degenerativas, doenças cardiovasculares e desordens do sistema imune. Como antioxidantes, as manoproteínas interagem com diferentes espécies radicais e diminuem a indução de mutações por agentes sequestrantes das espécies reativas de oxigênio (ROS) (KRIŽKOVÁ et al., 2001; DRÁBIKOVÁ et al., 2009). Desta forma, mananas de parede celular também exercem grande atividade antimutagênica, a qual está correlacionada com a atividade antioxidativa da molécula.

Esses polissacarídeos, além de agir como antioxidantes, também podem interagir com diferentes receptores extracelulares ou agir na modulação de

várias vias de sinalização intracelular a fim de diminuir a produção de ROS por neutrófilos do sangue (DRÁBIKOVÁ et al., 2009).

Manoproteínas derivadas da parede celular de *S. cerevisiae* quando administradas na alimentação de *Dicentrarchus labrax*, um primitivo peixe do mar, desafiados com *Vibrio alginolyticus*, desencadearam o aumento da resistência à infecção devido à inibição da colonização dos patógenos ao epitélio da mucosa intestinal. Além disso, promoveram aumento do peso corporal pela ingestão de aminoácidos presentes e/ou devido à melhora na integridade funcional da membrana dos enterócitos, e redução da deposição de gorduras em células do fígado devido à redução da absorção de colesterol e aumento dos sais biliares (TORRECILLAS et al., 2007).

Desde que a adesão apresenta o primeiro passo na invasão microbiana, o bloqueio dos receptores tipo lecitina específicos à manose (fimbriais tipo 1) encontrados em bactérias enteropatogênicas através da ligação da α -D-Manana de parede, e o impedimento de sua aderência à glicoproteínas de superfície ricas em manose de vilosidades, pode prevenir a colonização ou eliminar a infecção. Desta forma, polissacarídeos de parede celular de leveduras podem ser usados para manutenção da saúde animal e como estimuladores de crescimento natural em detrimento do uso de antibióticos como promotores de crescimento (KOGAN; KOCHER, 2007).

2.3.2 Propriedades Emulsificantes

Estudos recentes têm mostrado que fungos filamentosos são produtores de um agente contendo um complexo polissacarídeo-proteína capaz de estabilizar emulsões óleo em água, aonde as leveduras se destacam na fabricação de emulsificantes (BARRIGA et al., 1999).

Geralmente bioemulsificantes são metabólitos microbianos compostos de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas e alguns mais comumente estudados incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos de lipídeos-polissacarídeos ou proteínas-polissacarídeos. A maioria dos compostos de origem microbiana tem inúmeras vantagens devido a sua natureza biodegradável,

efetividade a uma grande faixa de temperatura, pH e salinidade, e síntese sob condições desejáveis e fáceis, o que aumenta seu potencial de aplicação industrial, incluindo setores alimentícios, farmacêuticos e ambientais (SHEPHERD et al., 1995; COSTA, 2008).

Torabizadeh et al. (1996) extraíram manoproteínas da parede celular de *S. cerevisiae* e concluíram que essas moléculas agiram como um excelente emulsificante quando comparados com outros compostos sintéticos, além das emulsões terem permanecido estáveis em uma grande faixa de pH e diferentes níveis de NaCl quando armazenadas à 4 °C durante 30 dias.

Manoproteínas extraídas de *S. cerevisiae* têm se mostrado como um efetivo bioemulsificante, produzindo emulsões viscosas, além de ser um produto de baixa toxicidade, uma vez que é um produto comestível usado em alimentos e bebidas. Esses produtos cumprem com a atual demanda do consumidor para produtos naturais e ambientalmente seguros quando comparados a compostos sintéticos. Além disso, o processo de extração do bioemulsificante a partir de leveduras descartadas em processos industriais é simples e economicamente viável, uma vez que o processo converte grandes volumes de biomassa de levedura de baixo valor em um produto de alto valor agregado (TORABIZADEH et al., 1996; LUKONDEH et al., 2003; COSTA, 2008).

De acordo com Barriga (1999), o desenvolvimento de uma melhor propriedade emulsificantes da MP ocorre quando sua molécula contém uma maior quantidade de proteínas em relação à fração de carboidratos, embora este último, em concentrações adequadas, seja responsável pela solubilidade do composto e a estabilidade da emulsão.

Apesar disso, manoproteínas extraídas de *Kluyveromyces marxianus* compostas por apenas 4-6% de proteínas também foram estabelecidas por ter um excelente potencial emulsificante natural para uso em alimentos processados devido a sua propriedade de estabilidade ao longo de um vasto leque de condições químicas e físicas em longo tempo, os quais podem ter várias aplicações comerciais em produção de alimentos. A concentração de MP usada também altera as propriedades emulsificantes e, além disso, é importante para aplicações industriais devido ao alto custo que pode ser associado ao uso de grandes quantidades (LUKONDEH et al., 2003).

Além do potencial emulsificante apresentado, as manoproteínas podem ser produzidas com facilidade devido à grande disponibilidade de matéria-prima e o baixo custo, como as leveduras descartadas como subproduto de cervejarias, vinícolas e usinas de álcool, além de serem facilmente extraídas com água a altas temperaturas (COSTA, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar a manoproteína extraída da parede celular da levedura *Saccharomyces uvarum* presente no creme de levedura e avaliar sua ação como cicatrizante, bioemulsificante e moduladora da resposta imune.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a manoproteína através da extração da parede celular da levedura *Saccharomyces uvarum* descartada como subproduto de cervejaria (creme de levedura);
- Determinar a composição centesimal, quantificação e caracterização de açúcares e aminoácidos da molécula de manoproteína;
- Determinar o peso molecular da fração protéica da molécula de manoproteína;
- Avaliar as propriedades emulsificantes da manoproteína;
- Avaliar a atividade cicatrizante da manoproteína em suínos;
- Investigar a ação da manoproteína sobre a resposta imune inata e humoral através de testes *in vitro* e *in vivo* em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÃO DA MP

4.1.1 Matéria-Prima

A matéria prima utilizada neste estudo é a MP, extraída da parede celular da levedura *Saccharomyces uvarum*, linhagem W-3460, gentilmente cedida pela cervejaria Fábrica 1, localizada na cidade de Londrina/PR, e coletada em suspensão celular denominada creme de levedura obtida após o processo de produção de cerveja.

4.1.2. Autólise e Obtenção da Parede Celular

O creme de levedura foi previamente preparado para a autólise adicionando-se 20% (p/v) de água destilada e tamisado sequencialmente em malhas de 0,59 e 0,18mm. Posteriormente, a suspensão foi adicionada de água destilada até a obtenção de 20% (p/v) de sólidos totais em base seca, ajustada para pH 5.0 utilizando soluções de NaOH ou HCl 1N e mantida a 50 °C, sob agitação, durante 24 horas conforme Oliveira (2001). Decorrido este tempo, a suspensão passou por centrifugação (3500 x g, 5 minutos, 10 °C) e o precipitado, correspondente à parede celular, lavado com água destilada, novamente centrifugado e reservado. Através deste calculou-se o rendimento do processo de autólise.

4.1.3 Extração da Manoproteína

A extração foi realizada seguindo o procedimento preconizado por Costa (2008), aonde a parede celular obtida do processo anterior é ressuspendida em água destilada até atingir concentração de 10% (p/v) em base seca e, em seguida, tratada termicamente à 95 °C durante 9 horas, sob agitação de 100 rpm. Em seguida, a solução foi resfriada até 45 °C e centrifugada (3500 x g, 10 minutos, 10 °C). O sobrenadante foi recuperado, adicionado de três volumes de etanol absoluto e armazenado a 4 °C por 12 horas para precipitação total da MP. Após esse período o material foi centrifugado (3500 x g, 5 minutos, 10 °C) e os resíduos sólidos, ou MP, passaram por duas lavagens com etanol absoluto e em seguida recuperados por centrifugação sob as mesmas condições anteriores. A MP precipitada foi liofilizada e o rendimento do processo de extração calculado.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MANOPROTEÍNA

4.2.1 Composição Centesimal da MP

A partir da MP liofilizada foi feita a composição centesimal da mesma, através das determinações de umidade em estufa a 105 °C, resíduo mineral fixo (cinzas) em mufla a 550 °C, teor de proteínas bruta pelo método de micro-Kjeldahl (%N x 6,25) e lipídeos por Soxhlet de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2005). O teor de carboidratos foi estimado pela diferença de peso entre os sólidos totais e os outros componentes determinados.

Também foram determinados a quantidade de proteínas solúveis baseada no método de Lowry (1951), e carboidratos totais através do método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para se avaliar quais os tipos de açúcares estão presentes na molécula de MP foi realizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Desta forma, utilizou-se somente água ultrapura e reagentes com alto grau de pureza para cromatografia líquida de alta eficiência.

4.2.2.1 Preparo das amostras

Amostras de MP liofilizada foram totalmente hidrolisadas em tubo fechado, em triplicata, com adição de HCl 2N na proporção de 3:100 (m/v), e levadas à estufa a 105 °C por 16 horas de acordo com metodologia adaptada da técnica de Moreira (1998).

Após esse período, as amostras foram filtradas em papel filtro comum e, em seguida, uma alíquota de 1 mL dessa solução hidrolisada foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL completando até a marca com água ultrapura (diluição 1:50). A solução resultante foi filtrada em Sep-Pak C18 Waters, pré-condicionado com metanol e água, e em membrana 0,22 µm de hidroximetilcelulose, descartando os primeiros mililitros. O filtrado foi coletado e levado ao sistema cromatográfico para análise.

4.2.2.2 Condições cromatográficas

O sistema instrumental utilizado para as análises por CLAE consistiu em um Cromatógrafo Líquido inerte (*PEEK*) com pré-coluna (CarboPac PA1 – Dionex) e coluna de troca iônica aniônica de alta performance, composta de resina de poliestireno-divinilbenzeno (CarboPac PA1 – Dionex) 10mm x 250 mm x 4 mm, temperatura de 28 °C controlada por forno termostaticado (Waters), fase móvel

composta de NaOH 1,4 mmol/L, fase regeneradora de NaOH 300 mmol/L e fluxo de 1,0 mL/min com detector eletroquímico de pulso amperométrico.

A curva de calibração foi preparada com uma solução padrão composta por uma mistura de carboidratos nas seguintes concentrações: 3,0000 µg/mL de Manitol; 30,0000 µg/mL de Arabinose; 120,0000 µg/mL de Galactose; 45,0000 µg/mL de Glicose; 12,0000 µg/mL de Xilose; 90,0000 µg/mL de Manose; 45,0000 µg/mL de Frutose. Os padrões foram utilizados após uma semana de dessecação em dessecadores de vidro com vácuo e pentóxido de fósforo, devido ao seu alto poder higroscópico.

4.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada para estimar o peso molecular das proteínas presentes na molécula de MP. Deste modo, essa determinação foi realizada segundo a metodologia de Towbin e Gordon (1984), onde as proteínas são separadas de acordo com o seu tamanho. Para isso, preparou-se uma solução de MP com concentração de 50µg/mL com base no teor de proteínas da amostra obtida pelo método de Lowry (1951), a qual foi separada em gel de poliacrilamida 12% e revelada com corante Comassie Brilliant Blue. O gel foi descorado em solução contendo 10% de ácido acético e 40% de metanol, renovando a solução até obtenção de revelação nítida. Os resultados foram comparados ao padrão (BenchMarck™ Protein Ladder – Invitrogen®), o qual continha uma mistura de proteínas com pesos moleculares entre 10 e 220 kDa.

4.2.4 Determinação de Aminoácidos

A quantificação de aminoácidos foi feita pelo laboratório de Fontes Protéicas, no Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas-SP, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida da Alta Eficiência, baseada na metodologia descrita por White et al. (1896).

4.3 PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DA MP

A atividade emulsificante e estabilidade física e química das emulsões foram realizadas em duplicata e avaliadas segundo as metodologias aplicadas por Lukondeh et al. (2003).

4.3.1 Efeito da Concentração da Manoproteína

Para calcular o efeito de várias concentrações da MP sobre a atividade emulsificante, MP liofilizada foi dissolvida em 4 mL de água destilada variando suas concentrações em uma faixa entre 1 e 55 g.L⁻¹. Em seguida adicionou-se 6 mL de óleo de soja em cada frasco e as soluções foram agitadas a 9500 rpm durante um minuto em homogeneizador Ultra-Turrax. As emulsões obtidas foram acondicionadas em tubos graduados de fundo reto e conservadas à temperatura ambiente por 24 horas.

A atividade emulsificante, observada pelo percentual da mistura que permaneceu emulsionada após esse período, foi determinada pela equação seguinte:

$$\%AE = \frac{Alte}{AltT} \times 100$$

onde:

AE = Atividade emulsificante

Alte = Altura da emulsão

AltT = Altura total da solução

A concentração de MP que mostrou maior percentagem de atividade emulsificante após 24 horas foi utilizada para o preparo das soluções emulsificantes nos ensaios de efeito de pH e concentração de NaCl.

4.3.2 Efeito do pH

Uma amostra contendo a concentração de MP que apresentou a melhor AE foi dissolvida em 4 mL de água destilada e o pH ajustado com soluções de 0.1 M HCl ou 0.1 M NaOH para valores em uma faixa entre 2-11. Em seguida, adicionou-se mais 6 mL de óleo de soja e as soluções passaram por agitação a 9500 rpm durante um minuto em homogeneizador Ultra-Turrax para homogeneização dos componentes. As misturas foram mantidas por 30 dias à 4 °C e a estabilidade da emulsão calculada.

$$\%EE = \frac{Alte}{AltT} \times 100$$

onde:

EE = estabilidade da emulsão

Alte = Altura da emulsão

AltT = Altura total da solução

4.3.3. Efeito do NaCl

Para medir o efeito da NaCl na estabilidade das emulsões, uma amostra contendo a concentração de MP que apresentou a melhor AE foi dissolvida em 4 mL de água destilada contendo quantidades de NaCl entre 0-50 g.L⁻¹. Posteriormente, 6 mL de óleo foi adicionado, as misturas homogeneizadas a 9500 rpm durante um minuto em homogeneizador Ultra-Turrax, reservadas por 30 dias à 4 °C, e a estabilidade da emulsão calculada.

O cálculo da estabilidade da emulsão ao pH e diferentes concentrações de NaCl foram aplicados separadamente por um emulsificante conhecido, albumina de ovo de galinha ou ovalbumina (OV) (SIGMA), e comparadas aos valores obtidos àqueles encontrados pela MP.

4.4 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

4.4.1 Atividade Cicatrizante da MP

A avaliação da atividade cicatrizante da MP foi realizada na granja Karia, localizada na cidade de Londrina/PR, aonde foram utilizados 47 suínos machos da raça Landrace, com idades entre 7 e 21 dias, os quais foram divididos em dois lotes de criação e distribuídos em dois tratamentos, controle e MP, marcados com brincos numerados para diferenciação dos mesmos.

Durante todo o período experimental de 7 dias foram fornecidos água e ração *ad libitum* para todos os animais, e estes foram alojados e criados conforme manejo normal da granja.

Os animais foram castrados no dia 1 do experimento e, em seguida, aplicou-se sobre a incisão dos testículos direito e esquerdo um produto comercial usualmente utilizado na granja para os animais do tratamento controle, e MP a 2% em água destilada nos demais suínos com a ajuda de um borrifador. Em seguida, a extensão dos cortes foram medidos com o auxílio de um paquímetro e o tamanho, em milímetros (mm), anotado.

Nos dias 3, 5 e 7 do experimento os cortes dos testículos direito e esquerdo de todos os animais foram novamente medidos e os valores comparados ao inicial (dia 1) para avaliação da redução do tamanho da ferida.

4.4.2 Avaliação in vivo da Resposta Imune Humoral: Experimento Piloto

Para determinar a melhor quantidade de MP a ser usada nos experimentos sobre resposta imune humoral, foi avaliada a produção de anticorpos utilizando 30 camundongos machos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), com peso entre 25 – 30 g, os quais foram distribuídos nos seguintes tratamentos:

Tratamento A – controle negativo;

Tratamento B – controle positivo;

Tratamento C – 10 µg de MP;

Tratamento D – 100 µg de MP;

Tratamento E – 1000 µg de MP.

Durante todo o período experimental de 7 dias foram fornecidos água e ração *ad libitum* para todos os animais.

Cada tratamento foi composto de 6 repetições, considerando cada animal como uma repetição, e estes foram desafiados com hemácia de carneiro a 2% por via intraperitoneal (i.p.) no dia 0 do experimento, com exceção do tratamento controle negativo.

Nos tratamentos C, D e E, os animais receberam MP pela via i.p. no mesmo dia do desafio, ou seja, no dia 0 do experimento, e os animais dos grupos A e B receberam tampão fosfato-salina (PBS) 1X, o mesmo veículo utilizado para o preparo da solução de MP. As amostras de MP e PBS foram aplicadas no peritônio dos camundongos anteriormente à injeção do desafio. No dia -1, amostras de sangue foram coletadas dos animais por punção cardíaca, e no dia 7 foi feita a sangria dos animais com coleta de sangue. As amostras de plasma de todos os animais foram conduzidas para análise de hemaglutinação e avaliação da melhor concentração de MP utilizada.

4.4.2.1 Análise de hemaglutinação

A análise de hemaglutinação baseia-se na aglutinação de eritrócitos de carneiro na presença de anticorpos específicos no soro e foi realizada para determinar o título de imunoglobulinas totais (IgTotais), IgG e IgM presentes no plasma dos animais desafiados com hemácia de carneiro e tratados com diferentes soluções de MP.

Amostras de plasma de todos os animais foram inativadas a 56 °C por 30 minutos em banho maria antes da utilização. Em seguida, fez-se uma diluição seriada de fator 2 destas amostras em placas de microtitulação com fundo em U já adicionadas de 25 µl de PBS 1X em todos os poços. Assim, adicionou-se 25 µl de plasma inativado no poço 1 da placa, fez-se a homogeneização da solução e a transferência de 25 µl para o orifício seguinte, repetindo o mesmo processo até o

poço 11 aonde o mesmo volume da solução foi desprezado. Este procedimento foi realizado para todas as amostras de plasma inativadas dos animais.

Em seguida, foi adicionado igual volume de hemácia de carneiro a 2% em cada poço, e a placa incubada por 1 hora a 37 °C, e mais 22 horas a 4 °C. Após esse período realizou-se a leitura visual das placas, comparando o padrão de sedimentação do poço controle sem plasma (poço número 12) com os padrões de sedimentação dos demais. O título de anticorpos totais foi identificado como a maior diluição em que se observa uma aglutinação positiva das hemácias.

Para a determinação do título de IgG, 50 µl das amostras de plasma inativadas foram incubadas com igual volume de 0,2M de β-mercaptoetanol por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, procedeu-se a diluição seriada fator 2 como descrito anteriormente. O título de IgM foi determinado com a subtração dos valores do título de IgT e os valores encontrados para IgG.

4.4.3 Avaliação in vivo da Resposta Inume Humoral

Após a avaliação da melhor concentração de MP utilizada no experimento anterior, um novo experimento foi realizado utilizando 40 camundongos machos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), com peso entre 25 – 30 g, os quais foram distribuídos nos seguintes tratamentos:

Tratamento A – controle positivo;

Tratamento B – 1000 µg de MP inoculados juntos;

Tratamento C – 100 µg de MP inoculados juntos;

Tratamento D – 100 g de MP inoculados 6 horas antes;

Tratamento E – 100 µg de MP inoculados 24 horas antes.

Durante todo o período experimental de 35 dias foram fornecidos água e ração *ad libitum* para todos os animais.

Cada tratamento foi composto de 8 repetições, considerando cada animal como uma repetição, e estes foram desafiados com hemácia de carneiro a 2% por via i.p. nos dias 0 e 28 de experimento.

Nos tratamentos B e C os animais receberam MP pela via i.p. nos mesmos dias do desafio, ou seja, nos dias 0 e 28. Já o grupo D recebeu a solução

de MP nos mesmos dias, embora 6 horas antes do desafio e o grupo E, 24 horas antes do desafio. No controle positivo, grupo A, foi inoculado o mesmo veículo utilizado para o preparo da solução de MP (PBS 1X). Os animais de cada tratamento receberam um volume de 200 μ L de solução contendo as quantidades de MP descritas anteriormente.

Nos dias -1 e 7 do experimento amostras de sangue foram coletadas dos animais por punção cardíaca, e no dia 35 foi feita a sangria dos animais com coleta de sangue e avaliação dos pesos do timo, baço e fígado. As amostras de plasma de todos os animais também foram conduzidas para análise de hemaglutinação e determinação dos níveis de anticorpos totais, IgG e IgM, como descrito no item 4.4.2.1.

4.4.4 Quantificação *in vitro* de Óxido Nítrico (NO) por Macrófagos Peritoneais

Tendo em vista a capacidade da MP em estimular a produção de óxido nítrico por células do sistema imunológico, fez-se a quantificação do mesmo através de ensaio *in vitro* com macrófagos peritoneais.

A produção de NO é determinada através da medida de nitritos no sobrenadante de culturas de macrófagos, utilizando o microensaio descrito por Peres e Curi (2005). Para a obtenção de macrófagos peritoneais inflamatórios, os animais foram injetados pela via i.p. com 1mL de caldo tioglicolato 5% para atração destes à cavidade peritoneal. Após 4 dias, injetou-se 5 mL do meio RPMI de lavagem, gelado, no peritônio de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c. Em seguida, o abdômen destes foi massageado durante 30 segundos para a promoção do deslocamento das células da parede interna da cavidade peritoneal. Após esse período, a pele da região abdominal dos animais foi removida e a cavidade aberta para a retirada do fluido contendo as células, com a ajuda de uma pipeta Pasteur. A suspensão celular foi centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI de lavagem. Em um tubo plástico de 1,5 mL adicionou-se 180 μ L de azul de tripan 0,2% e 20 μ L da suspensão de células, a solução foi homogeneizada e 10 μ L foi transferido para hemocitômetro de Neubauer (Hirschmann, Techcolor) para

contagem total de células realizada com auxílio de microscópio de luz. A concentração da suspensão de células com mais de 95% de viabilidade foi ajustada para 1×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen).

A seguir, 200 μ L da suspensão de células (1×10^6 células/mL) foram transferidos para cada cavidade de placa de cultura (96 orifícios) de fundo chato e colocados em estufa a 37 °C por 24 horas, em atmosfera úmida, a 5% de CO₂, para promover a adesão dos macrófagos. Após esse período realizou-se um ciclo de três lavagens dos orifícios com PBS morno para a remoção das células não aderentes. Em seguida, foram adicionados mais 180 μ L do meio, ou 160 μ L + 20 μ L de lipopolissacarídeos (LPS) sobre as células aderidas quando se desejou analisar o efeito do LPS sobre a produção de NO. Posteriormente, adicionou-se mais 20 μ L de solução de MP nos mesmos orifícios, em duplicata, nas seguintes concentrações: 100 μ g/mL; 50 μ g/mL; 25 μ g/mL; 12,2 μ g/mL; 6,125 μ g/mL. O grupo controle foi mantido sem adição da solução de MP para comparação dos resultados.

A placa foi incubada por um período de 24 horas em estufa a 37 °C, atmosfera úmida, a 5% de CO₂ e, após esse período de incubação, 50 μ L dos sobrenadantes das células foram transferidos para placa de leitura. Em seguida, foi adicionado o reagente de Griess (Sulfanilamida 0,4 g em 20 mL de ácido fosfórico 5% - protegido da luz) na proporção de 1:1 (v/v) com o sobrenadante. A placa foi deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos e a leitura realizada em leitor de microplaca Multiskan FX a 550 nm. Os valores de absorbância foram comparados com uma curva padrão de NaNO₂ de concentrações conhecidas e os resultados expressos em μ M de nitrito liberado por 1×10^6 células.

4.4.5 Avaliação *in vivo* da Resposta Imune Inata

Foram utilizados 10 camundongos fêmeas, isogênicos, da linhagem BALB/c, os quais foram distribuídos aleatoriamente em 2 tratamentos distintos: grupo controle e tratados com MP. Foi disponibilizado aos animais água e ração *ad libitum* durante o período experimental de 10 dias.

O grupo tratado com MP foi composto por 6 animais e estes receberam 200 μL de uma solução de MP (100 mg/Kg de peso) em PBS pela via i.p. uma vez ao dia, durante os 10 dias de experimento. Já o grupo controle foi composto de 4 animais, os quais receberam o mesmo volume do veículo utilizado para o preparo da solução de MP durante todo o período experimental.

Após os 10 dias de experimento foram retiradas amostras de sangue e plasma dos animais, e a obtenção de macrófagos peritoneais para a realização de análises imunológicas.

4.4.5.1 Quantificação de NO do plasma

Para estimativa da concentração de NO nas amostras, foi realizado o procedimento segundo Panis (2009) adaptado da técnica de determinação de nitrito em plasma humano descrita por Navarro-González *et al.* (1998). O método baseia-se na redução do nitrato presente no plasma a nitrito, mediada por reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess, a 550 nm em leitor de microplaca.

O primeiro passo para estimativa de óxido nítrico nas amostras de plasma foi a desproteinização, pois as proteínas podem influenciar na técnica. Assim, as amostras previamente coletadas foram descongeladas em banho de gelo, de onde se retirou 60 μL de amostra para tubo *ependorf*, 50 μL de ZnSO_4 75 mM e, após homogeneização em vórtex (30 segundos), as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10000 rpm a 4^oC. Em seguida, foram adicionados 70 μL de NaOH 55 mmol/L e novamente homogeneizado em vórtex por 30 segundos. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm a 4^oC, com posterior recuperação de 250 μL do sobrenadante, adicionando-se 50 μL de tampão glicina-NaOH 45 g/L pH 9,7.

Em seguida procedeu-se com a ativação dos grânulos de cádmio, os quais estavam estocados em H_2SO_4 100 mM. Estes foram lavados com H_2O

destilada três vezes e então deixados em contato com solução de CuSO_4 5 mM em tampão glicina-NaOH 15 g/L pH 9,7 por 5 minutos. Os grânulos ativos foram utilizados dentro de 10 minutos e aqueles que ficaram pretos após serem lavados com H_2SO_4 foram descartados. Após essa ativação dos grânulos adicionou-se 400 mg de grânulos de cádmio ativados ao sobrenadante recuperado em tampão, deixando a mistura sob agitação contínua por 10 minutos. Após este tempo transferiu-se 50 μL de cada amostra para cada poço de microplaca, adicionou-se 50 μL de reagente de Griess. Em seguida, a placa foi deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos, e medida sua absorbância a 550 nm em leitor de microplaca Multiskan FX.

4.4.5.2 Efeito do Tratamento *in vivo* com MP sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais residentes

A quantificação do NO foi realizada através de macrófagos residentes obtidos da cavidade peritoneal dos camundongos da linhagem BALB/c tratados com MP e dos animais do grupo controle (PBS), com ou sem a adição de LPS, através da técnica descrita no item 4.4.4. (Quantificação *in vitro* de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais), embora sem a incubação dos macrófagos com a solução de MP.

4.4.5.3 Análise hematológica

A análise hematológica foi realizada segundo Malvezi (2003), aonde 1,0 mL de sangue de cada camundongo foi obtido através de punção cardíaca e acondicionados em tubos de ensaio contendo 20 μL do anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) a 5%.

4.4.5.3.1 Contagem total de plaquetas

Para a contagem total de plaquetas, amostras de sangue com EDTA ($v = 5 \mu\text{L}$) foram cuidadosamente transferidas para tubos de ensaio de 12 x 75 mm contendo 1,0 mL de citrato trissódico (diluição 1:200). A seguir, esta solução foi homogeneizada e transferida para um hemocitômetro de Neubauer, mantida por 10 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente antes do início da contagem em microscópio (Olympus, CH30), com aumento final de 400x. O número de plaquetas foi calculado da seguinte maneira:

$$\text{[Fator de diluição x Fator de profundidade = Fator final]}$$

$$\text{[Fator final x células contadas em 80 quadrados menores da área central da câmara = células/mm}^3 \text{ (}\mu\text{L)}\text{]}$$

4.4.5.3.2 Determinação do volume globular (VG)

O volume globular, ou hematócrito, refere-se à percentagem ocupada pelos glóbulos vermelhos no volume total de sangue, e foi realizado através do método do microhematócrito, onde um pequeno volume de sangue foi transferido por capilaridade para um tubo capilar não graduado (Perfecta), com 75 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro interno, deixando vazios 15 mm. Em seguida, selou-se a extremidade distante da coluna de sangue pelo calor e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm em microcentrífuga (microhematócrito-DMH2, Benfer do Brasil). A leitura foi realizada depositando o capilar sobre tabela (CELM) contendo escala apropriada, excluindo-se da leitura os valores da camada de leucócitos e plaquetas. O VG foi expresso em percentagem.

4.4.5.3.3 Contagem de reticulócitos

Em tubo de ensaio 10 x 50 mm contendo 40 μL de sangue homogeneizado, adicionou-se 20 μL de Azul de Cresil Brilhante a 1% em solução citrato salínico, o qual foi mantido em banho Maria a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. Em seguida, preparou-se distensões de sangue em lâminas e deixadas para secar à temperatura ambiente.

A contagem de reticulócitos foi feita através da contagem de 5 campos de cada lâmina com aproximadamente 200 hemácias. O número de reticulócitos encontrados foi dividido por 10 e o resultado expresso em percentagem.

4.4.5.3.4 Contagem total de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada manualmente, aonde as amostras de sangue previamente homogeneizadas foram diluídas na proporção de 1:20 (v/v) em líquido de TurkK (20 mL de ácido acético glacial, 1 mL de azul de Cresil Brilhante em 1000 mL de água destilada q.s.p.), o qual provoca lise das células anucleadas (hemácias). As soluções foram agitadas vagarosamente, deixadas em repouso por 5 minutos e, após nova homogeneização realizou-se a contagem dos leucócitos em hemocítmetro de Neubauer utilizando 4 quadrantes laterais da câmara e objetiva de 40x, e os resultados expressos em mm^3 , como mostrado a seguir:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos encontrados} \times \frac{1\text{mm}^3}{0,4\text{mm}^3} \times 20 \text{ (diluição)}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos encontrados} \times 1\text{mm}^3 = \frac{20}{40}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos encontrados} \times 50 = 1\text{mm}^3$$

4.4.5.3.5 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial leucocitária é uma técnica utilizada juntamente com outras para se avaliar a imunocompetência do indivíduo de acordo com a proporção dos tipos celulares do sistema imunológico.

Amostras de sangue heparinizadas foram utilizadas para o preparo de esfregaço sanguíneo com cabeça, corpo e cauda, em lâminas de vidro de 26 x 76 mm previamente limpas com álcool. Depois de feito o esfregaço, as lâminas foram secas a temperatura ambiente, ao ar livre, por aproximadamente 2 horas e, então, coradas pelo método de May Grunwald-Giensa.

Para isso, adicionou-se 20 gotas do corante May Grunwald (Merck) sobre o esfregaço permitindo sua ação por 3 minutos para fixação do material com a ajuda do metanol presente na solução e, após esse período, as lâminas foram cobertas com 20 gotas de H₂O tamponada deixando-a agir por mais 3 minutos. Desprezada essa solução, as lâminas foram mergulhadas em corante Giensa diluído em água destilada na proporção de 1:10 (v/v) por 10 minutos para coloração dos leucócitos. Após esse período, as lâminas foram lavadas, secas ao ar livre e os esfregaços observados ao microscópio óptico em objetiva de imersão. Fez-se contagem classificatória para linfócitos, monócitos, eosinófilos e segmentados, calculando-se a proporção de cada tipo em 100 células contadas, determinando o valor relativo e o valor absoluto (em mm³) dos leucócitos encontrados.

4.4.6 Análise Estatística do Experimento

Todo experimento foi realizado de acordo com os conceitos da estatística, sendo inteiramente casualizado para avaliação dos parâmetros imunológicos, e as análises laboratoriais foram feitas com repetições em triplicata. Foram realizadas análise de variância e teste de Tukey para se avaliar isoladamente as médias de cada tratamento na quantificação do título de anticorpos totais, IgG e IgM produzidos no mesmo dia (7 e 35 dias) e peso dos órgão linfóides, além da quantificação do teor de óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais in vitro e

in vivo nos diferentes tratamentos. O título de Imunoglobulinas entre os diferentes dias, a quantificação de óxido nítrico produzido no plasma e in vitro entre os grupos estimulados ou não por LPS e as análises hematológicas foram submetidos ao teste T de Student, todos avaliados no programa Statistica 7.

Para a atividade cicatrizante o delineamento foi inteiramente ao acaso, com 2 tratamentos e 4 dias de avaliação, em um esquema fatorial 2 x 4. Os dados foram analisados com o uso do programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (2000), utilizando análise de variância, teste de Tukey a 5% e análise de regressão do tamanho das feridas em função dos dias de avaliação. O tamanho das feridas iniciais (dia 1) nos testículos esquerdo e direito foram considerados como covariável para as análises de redução das feridas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA MP

O rendimento do processo de extração da MP de parede celular de leveduras de cervejaria, desde a matéria prima até o produto final, está ilustrado na Figura 2. O creme de levedura utilizado partiu de um volume de 3,1L contendo 322,35g de massa seca total e, em seguida, foi tamisado para a eliminação de alguns compostos que permaneceram após o processo de fabricação da cerveja, perdendo 8,83g de massa total após esse procedimento. A partir do creme de levedura tamisado, ou seja, de 313,52g de massa seca total, fez-se a autólise das células, obtendo 273,12g de levedura autolisada seca, e o rendimento desse processo foi de 87,11% (p/p). De acordo com Liu et al. (2008), após a autólise das células de levedura à temperatura de 55 °C e 24 horas, 11% de manoproteínas foram liberadas no extrato, enquanto o restante foram removidos durante o processo de extração com água quente.

O autolisado assim obtido apresentou 155,05g de extrato (sobrenadante) e 146,31g de parede celular (biomassa), com rendimentos de 56% e 53% (p/p), respectivamente, todos em base seca. Esses resultados corroboram com Sgarbieri et al. (1999) que, após processo de autólise a partir de levedura originária de cervejaria, obtiveram rendimento similar para o extrato, em torno de 55 – 60%, e inferior para parede celular, o qual girou em torno de 40 – 45%. Entretanto, Costa (2008) obteve rendimento do processo de autólise em torno de 52% para a parede celular, a partir do creme de levedura com e sem a redução do teor de etanol. Após o processo de extração da MP, o sobrenadante obtido apresentou 13,59g de sólidos solúveis secos, o que representou rendimento de 9,29% (p/p) a partir da parede celular autolisada. Em seguida, o precipitado obtido após adição do etanol apresentou 5,67g de massa seca e foi designado de MP.

O rendimento do processo de extração da MP foi de 3,87% (p/p) em relação ao peso total da parede celular, superior ao rendimento encontrado por Costa (2008) que obteve 2,39% de manoproteínas a partir da parede celular obtida após o processo de autólise. Em contrapartida, Freimund et al. (2003) obtiveram

rendimento de 14% de MP a partir da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtida comercialmente em forma de pó, processada por meio de métodos não degradativos de obtenção de biomoléculas através de extração com água à 125 °C durante 5 horas. Já em relação à massa inicial do creme de levedura bruto, o rendimento do processo de extração da MP foi de 1,76% (p/p).

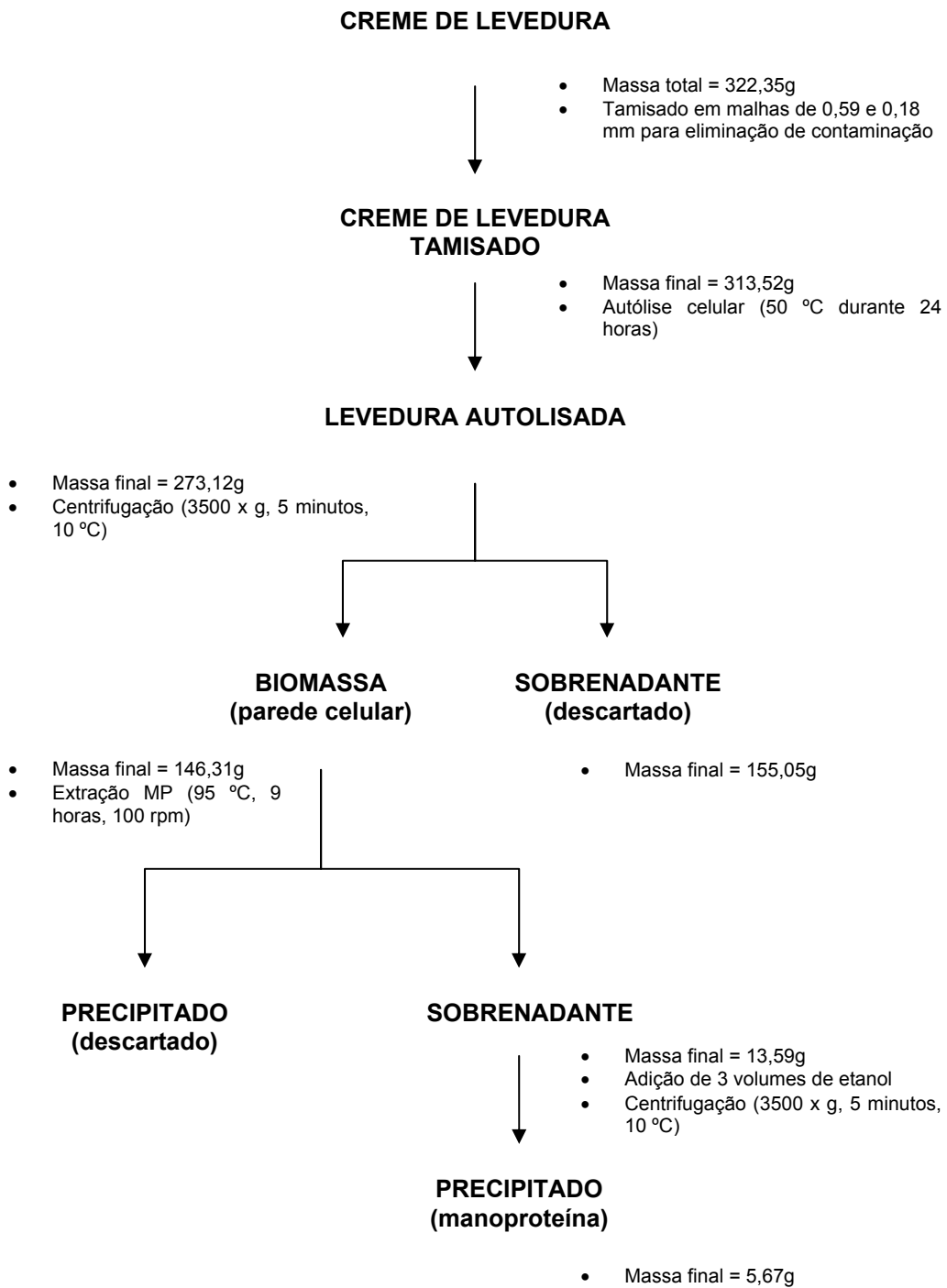


Figura 2 – Rendimento do processo de extração a partir do creme de levedura como matéria-prima até a obtenção de manoproteína como produto final, em base seca.

Cabe mencionar que no final do processo de produção da cerveja, são gerados grandes volumes de células excedentes (creme de levedura), os quais são descartados como subproduto (COSTA, 2008). Em algumas ocasiões esses microrganismos são processados e usados para a obtenção de diversos produtos empregados nos mais diversos segmentos industriais, a fim de diminuir os impactos ambientais (VILELA et al., 2000a; FUKUDA et al., 2009). Atualmente, o valor dessas células de levedura descartadas por uma cervejaria como creme de levedura está em torno de R\$30,00 a tonelada e, se considerarmos que o creme de levedura bruto contém 18% de sólidos e o rendimento da MP obtida após o processamento dessas células foi de 1,76% em relação à massa inicial do creme de levedura seco (Figura 2), então seriam necessários R\$9,47 para produzir 1Kg de MP.

De acordo com Costa (2008), faz-se necessária uma busca para aplicações dos microrganismos após sua utilização no processo primário de produção de cerveja já que, além de diminuir os impactos ambientais que podem ser causados, frações de parede celular, como a MP e a beta-glucana, são moléculas de alto valor agregado (YAMADA; SGARBIERI, 2005), sendo a última vendida no mercado por valores entre R\$4,00 e R\$14,00 o grama da molécula, o que proporciona altos lucros para o investidor, além do processo de extração ser simples e adequado para produção em grande escala (BARRIGA et al., 1999).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA MP EXTRAÍDA DA PAREDE CELULAR DE SACCHAROMYCES UVARUM

A Tabela 1 mostra os resultados da composição centesimal da MP extraída da parede celular de *S. uvarum* com valores em base seca.

Tabela 1 – Composição centesimal aproximada da manoproteína (MP) em base seca¹

Componentes	Concentrações (%)
Lipídeos	0,33
Cinzas	2,58
Proteína (N x 6,25)	18,98
Carboidratos totais	78,11
Proteínas solúveis*	14,74

* Resultados baseados no método de Lowry

¹ Análises realizadas em triplicata

Com base nos dados da tabela anterior pode-se observar que o principal constituinte da MP são os carboidratos, perfazendo 78,11% da composição total, o que permite afirmar que a molécula extraída corresponde à classe de manoproteínas com função estrutural na parede celular, as quais formam a camada externa da parede celular das leveduras, além de ser estar envolvida na retenção de água e proteção ao ressecamento (BARRIGA et al., 1999; KLIS et al., 2002). Esse resultado está de acordo com Freimund et al. (2003) que reportaram um teor de carboidratos de aproximadamente 81 a 83% para manoproteínas extraídas da parede celular de *S. cerevisiae*, e Lukondeh et al. (2003), que obtiveram valores em torno de 90 % para MP obtida da levedura *Kluyveromyces marxianus*, indicando que diferentes valores podem ser encontrados a partir de manoproteínas obtidas de diversas fontes e diferentes processos de extração.

O segundo maior constituinte encontrado na MP são as proteínas, com teor de 18,98%, sendo a maior parte composta por proteínas solúveis (14,74%). Esses resultados corroboram com os valores encontrados por Freimund et al. (2003), que obtiveram moléculas com aproximadamente 14 e 15% de proteínas solúveis. O teor de lipídeos e cinzas na composição da MP provavelmente deve-se à presença de resíduos da parede celular que não foram eliminados durante o processo de extração da MP e recuperação com etanol absoluto (item 4.1.3.). Geralmente a parede celular apresenta teores de aproximadamente 4,5% de lipídeos e 4,4% de cinzas em sua composição original (SGARBIERI et al., 1999).

Os tipos de açúcares presentes na fração de carboidratos da molécula de MP foram identificados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

e os resultados indicaram a presença de 86,12% de manose, 13,42% de glicose e 0,46% de xilose (Figura 3).

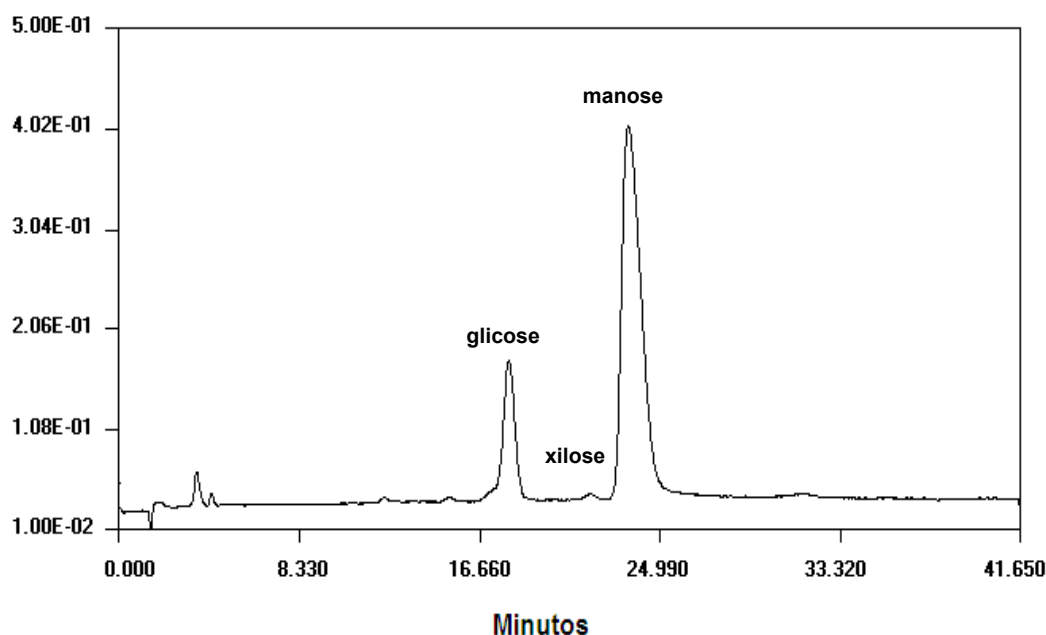


Figura 3 – Caracterização e quantificação dos açúcares presentes na molécula de manoproteína por cromatografia líquida de alta eficiência (coluna CarboPac PA1 – Dionex; eluente de NaOH 1,4 mmol/L; fluxo de 1,0 mL/min; T, 28 °C)

Manoproteínas isoladas de leveduras são compostas principalmente por polímeros de manose, embora ainda possam ser encontrados sacarídeos menores como a glicose, galactose e xilose, os quais podem apresentar um importante papel em sua atividade biológica (Križková et al., 2001). Freimund et al. (2003) purificaram e caracterizaram polissacarídeos de parede celular de *S. cerevisiae*, e obtiveram manoproteínas constituídas por uma grande fração de carboidratos, sendo estes compostos principalmente por manose (94%) além de uma pequena quantidade de glicose (6%). Esses resultados também foram encontrados em moléculas extraídas da parede celular de *Candida albicans*, aonde um total de 92,7% dos açúcares era composto de manose e 7,3% de glicose (GOMEZ et al., 1996).

Realizou-se também a estimativa do peso molecular da fração protéica da molécula de MP, o qual é de fundamental importância para conhecer suas propriedades específicas de interesse biotecnológico. O resultado é mostrado na figura a seguir:

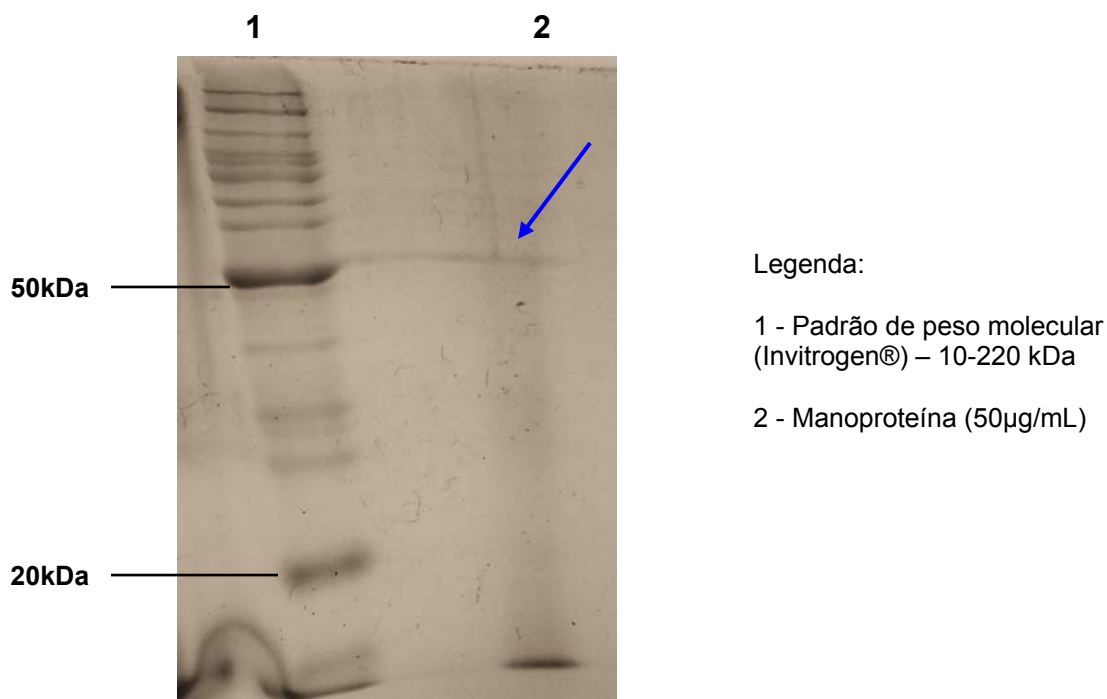


Figura 4 – Perfil eletroforético da manoproteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com Comassie Brilliant Blue

O perfil eletroforético de SDS-PAGE da MP revelou uma proteína com peso molecular de aproximadamente 52 kDa, como pode ser visualizado na Figura 4. Segundo Cameron (1992), proteínas de alto peso molecular (> 200 kDa) possuem propriedades de estabilizar emulsões pois produzem soluções viscosas e duráveis, enquanto aquelas de baixo peso molecular fornecem sistemas de superfície ativa, mantendo a tensão superficial de emulsões. O peso intermediário observado para a fração protéica sugere que a MP apresenta características de bioemulsificante, com capacidade tanto de reduzir a tensão superficial como de formar emulsões com boa estabilidade (COSTA, 2008).

Manoproteínas abrangendo diferentes faixas de pesos moleculares estão provavelmente associadas a diferentes composições químicas sendo, desta

forma, sua utilização possível nos mais diversos segmentos industriais. Essas moléculas com peso intermediário (entre 50 – 100 kDa), além de ser consideradas como efetivos bioemulsificantes (LUKONDEH et al., 2003), podem ter influência sobre o organismo, agindo como um produto de potencial imunestimulante e protegendo o hospedeiro contra possíveis infecções (GOMEZ et al., 2000), além de enriquecer as propriedades organolépticas de vinhos devido à interação de suas moléculas com os compostos aromáticos presentes (GONÇALVES et al., 2002).

A análise quantitativa utilizando cromatografia líquida de alta eficiência permitiu verificar a existência de aminoácidos essenciais na fração protéica da molécula de MP, além de confirmar a quantidade exata a que eles estão presentes, sendo o resultado mostrado na tabela a seguir:

Tabela 2 – Composição de aminoácidos essenciais e não essenciais da manoproteína extraída da parede celular da levedura de cervejaria *Saccharomyces uvarum*

Aminoácido essenciais (g/100g prod.)	Manoproteína¹	Padrão FAO/WHO²
Treonina	1,77	3,4
Metionina + cisteína	0,65	2,5
Valina	0,99	3,5
Leucina	0,97	6,6
Isoleucina	0,69	2,8
Fenilalanina + tirosina	1,37	6,3
Lisina	1,60	5,8
Histidina	0,43	1,9
Aminoácidos não essenciais (g/100g prod.)	Manoproteína¹	
Ácido aspártico	2,09	-
Ácido glutâmico	2,53	-
Serina	2,12	-
Glicina	1,03	-
Arginina	1,47	-
Alanina	1,37	-
Prolina	0,94	-

¹ Análises realizadas em triplicata

² FAO/WHO (1989): padrão teórico de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos de idade

Entre os aminoácidos presentes na molécula de MP, o ácido glutâmico, aspártico e serina foram os que ganharam maior atenção por se apresentarem em concentrações mais elevadas, além da treonina e lisina, que se

destacam por serem classificados entre os aminoácidos essenciais ao nosso organismo. A presença de serina e treonina era esperada devido à ligação O-glicosídica da molécula de manoproteína, aonde as hidroxilas de suas cadeias laterais ligam a fração protéica à cadeia curta de manana (KLIS et al., 2002).

A presença de ácido glutâmico é importante porque o glutamato é um dos principais componentes responsáveis pelo paladar atribuído à carne e, por isso, é muito utilizado como aditivo alimentar para realçar o sabor de alimentos. Já a presença de lisina é importante porque tornam os produtos de levedura ideais para misturas com cereais, no sentido de complementar esses aminoácidos essenciais que são, normalmente, deficientes em grãos de cereais (SGARBIERI et al., 1999).

Corroborando com os dados encontrados por Sgarbieri et al. (1999), os resultados do perfil aminoacídico também evidenciaram deficiência em aminoácidos sulfurados metionina mais cisteína. A composição de aminoácidos essenciais na molécula de MP não satisfaz as exigências do padrão teórico da FAO/WHO para crianças de 2 a 5 anos de idade, embora os valores reportados na literatura para células íntegras, autolizado total, extrato de levedura e parede celular de leveduras originárias de cervejaria tenham superado esses valores de referência (SGARBIERI et al., 1999; VILELA et al., 2000a; YAMADA et al., 2003; YAMADA; SGARBIERI, 2005).

Quando comparados à valores encontrados em uma molécula de MP com peso molecular de 65 kDa, extraída da parede celular da levedura *C. albicans*, o escore de aminoácidos essenciais da MP obtida de levedura de cervejaria mostrou-se superior, perdendo apenas para os resíduos de valina e isoleucina cujos valores representam 46% e 69,2%, respectivamente, daqueles encontrados por *C. albicans*. Já para os aminoácidos não essenciais, os níveis de ácido aspártico, glutâmico e prolina mostraram-se mais elevados do que aqueles encontrados para a fração protéica da MP de *C. albicans* (GOMEZ et al., 1996).

5.3 PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DA MP

A estabilidade de soluções utilizando a MP como bioemulsificante foi testada sobre uma série de condições químicas e físicas que podem ser

encontradas em diversas aplicações, principalmente nas indústrias alimentícias. Os resultados do efeito da concentração de MP sobre a atividade emulsificante estão apresentados na tabela a seguir:

Tabela 3 – Atividade emulsificante (AE) da ovalbumina e da manoproteína em diferentes concentrações após 24 horas à temperatura ambiente¹

Concentração emulsificante (g.L ⁻¹)	AE (%) ovalbumina	AE (%) manoproteína
1	86,81	0
5	92,43	82,33
10	96,70	83,83
15	96,15	85,00
20	96,68	90,04
25	100,00	91,27
30	100,00	92,97
35	97,08	93,20
40	95,13	95,63
45	96,16	96,27
50	94,81	96,87
55	95,48	97,27

¹ Análises realizadas em duplicata

De acordo com a Tabela 3 pode-se verificar que a MP oferece boas propriedades emulsificantes, pois apresentou elevados valores de atividade emulsificante (AE) com a adição de baixas concentrações da molécula, embora nenhuma emulsão tenha sido formada quando foram utilizados níveis menores do que 5g.L⁻¹. Além disso, os resultados de AE da MP foram crescentes e estáveis conforme o aumento da sua concentração na solução, atingindo o maior valor quando adicionada em seu maior nível (55g.L⁻¹), indicando que um máximo de 97,27% da fase de óleo da solução pode ser emulsificada com essa concentração do bioemulsificante. Chaud e Sgarbieri (2006) afirmaram que o aumento da concentração do bioemulsificante facilita a adsorção de um maior número de proteínas ao redor dos glóbulos de gordura, reduzindo a tensão interfacial, resultando em um aumento da capacidade emulsificante.

Lukondeh et al. (2003) testaram o efeito da concentração de um bioemulsificante natural, uma MP extraída da parede celular da levedura *K. marxianus*, e obtiveram emulsões estáveis por 90 dias a partir de uma concentração

de 4g.L^{-1} , embora com valores de estabilidade que chegaram ao máximo de 76%. Quando extraída da parede celular de *S. cerevisiae*, verificou-se um índice de emulsificação máximo de 79% à 8g.L^{-1} , diminuindo esse valor com o aumento da concentração do bioemulsificante (TORABIZADEH et al., 1996). Por outro lado, a MP obtida neste trabalho a partir da parede celular da levedura de cervejaria *S. uvarum* mostrou 82,33% de atividade emulsificante com nível de inclusão de apenas 5g.L^{-1} , e queda de apenas 15% no valor de estabilidade (de 97,27% para 82,82%) após 30 dias à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na concentração mais elevada.

Quando comparada ao emulsificante comercial, ovalbumina (OV), a MP apresentou AE inferior do nível mais baixo (1g.L^{-1}) até a concentração de 35g.L^{-1} , invertendo esse resultado nos níveis entre 40 e 55g.L^{-1} , aonde apresentou melhor poder emulsificante, como pode ser visualizado na Tabela 3. Em contrapartida, a OV chegou ao máximo grau de emulsificação nos níveis de 25 e 30g.L^{-1} , seguido de uma leve queda após esses valores até a última concentração estudada.

Contudo, pode-se observar que um baixo nível de MP já é o suficiente para formar emulsões estáveis de alta atividade emulsificante, uma vez que, para aplicações industriais, a concentração é de fundamental importância devido aos altos custos que podem estar associados com o uso de grandes quantidades. Esses dados corroboram com Chaud e Sgarbieri (2006), os quais afirmam que glicoproteínas extraídas da parede celular de leveduras de fermentação alcoólica possuem boa capacidade emulsificante e alto valor de estabilidade de emulsões (>70%) para as amostras em baixa concentração.

Também foram avaliadas a adição de NaCl e a mudança de pH sobre a estabilidade da emulsão de soluções contendo MP e OV, e os resultados estão apresentados na tabela abaixo:

Tabela 4 – Efeito do NaCl e diferentes pHs sobre a estabilidade da emulsão (EE) contendo ovalbumina (OV) e manoproteína (MP), e a diferença entre os seus resultados (OV – MP), durante armazenamento de 30 dias à 4 °C

	EE (%) ovalbumina ¹	EE (%) manoproteína ¹	OV - MP
Concentração NaCl (g.L⁻¹)			
0	96,51	82,82	13,69
5	98,66	83,31	15,35
10	97,96	87,49	10,47
15	100,00	85,99	14,01
20	96,09	86,28	9,81
25	99,57	85,56	14,01
30	100,00	83,97	16,03
35	100,00	86,20	13,80
40	99,34	84,05	15,28
45	96,35	86,53	9,82
50	95,96	84,34	11,61
pH			
2	99,06	80,76	18,30
3	95,39	85,48	9,91
4	96,01	82,34	13,68
5	98,57	83,79	14,79
6	100,00	87,48	12,53
7	97,77	89,05	8,72
8	92,27	87,40	4,88
9	96,76	87,90	8,85
10	97,95	78,12	19,83
11	100,00	79,44	20,56

¹ Análises realizadas em duplicata

A adição de NaCl em diferentes concentrações em soluções contendo 55g.L⁻¹ de emulsificante, ou seja, a concentração que obteve melhores resultados de AE, não influenciou nos resultados de estabilidade da emulsão para OV e MP, mantendo-as com valores elevados, embora esta última tenha apresentado valores inferiores de EE em relação ao emulsificante comercial.

A diferença entre os resultados de EE da ovalbumina e da MP em soluções adicionadas de NaCl, conforme apresentado na Figura 5, indicou que o menor valor entre elas está representado pelas concentrações de 20 e 45g.L⁻¹, sugerindo ser os níveis aonde as emulsões obtidas pela molécula de MP foram mais eficientes, pois atingiram uma menor diferença em relação àquela obtida pelo emulsificante comercial de grande poder emulsificante. Já a concentração de 30g.L⁻¹ é representada pelo pior nível utilizado para formar uma emulsão estável através do

bioemulsificante natural, já que é a resposta mais distante daquela observada para a OV.

De acordo com a Tabela 4 pode-se observar que os valores de EE encontrados para a MP permaneceram estáveis, variando entre 82,82 e 84,34% em soluções adicionadas de 0 a 50 g.L⁻¹ de NaCl. Esses resultados não foram corroborados por Lukondeh et al. (2003), os quais indicaram que a altura das fases de emulsão formadas em soluções contendo de 2 a 50 g.L⁻¹ de NaCl diminuíram de 75 a 70% conforme aumentou a concentração do sal na emulsão. Por outro lado, Torabizadeh et al. (1996), também obtiveram queda de 80 a 71% na fase de emulsão com o acréscimo de sal, o qual pode alterar as interações eletrostáticas seguido de coalescência dos glóbulos de gordura.

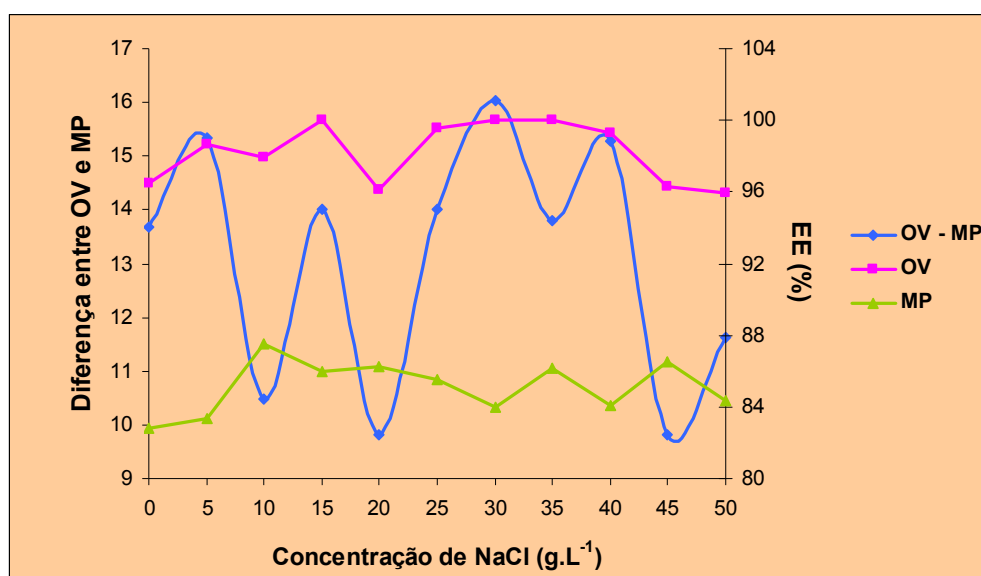


Figura 5 – Diferença (OV-MP) entre os valores de estabilidade de emulsões de manoproteína (MP) e ovalbumina (OV) armazenadas durante 30 dias à 4 °C com a adição de diferentes níveis de NaCl

As soluções contendo OV e MP na concentração de 55g.L⁻¹ também sofreram alterações de pH, para valores entre de 2 a 11, as quais, em seguida, foram adicionadas de óleo de soja e agitadas até a formação de emulsões estáveis. Os resultados da Tabela 4 indicam que as emulsões contendo OV não sofreram alterações excessivas, formando emulsões com 100% de estabilidade, ou seja, sem a liberação de água, nas soluções com valores de pH de 6 e 11. Já as soluções

contendo MP como emulsificante também formaram emulsões estáveis, com valores de EE próximos daqueles apresentados para a OV, apontando 80,76% de estabilidade no pH mais ácido, com leve aumento desse valor até o pH 7 aonde teve o nível máximo de estabilidade (89,05%), diminuindo, em seguida, até o pH 11 quando obteve fase de emulsão de apenas 79,44%, consistindo em um dos menores valores de estabilidade encontrados.

A diferença entre os resultados de EE da OV e MP (OV – MP) em emulsões com alteração no pH pode ser visualizado na Figura 6. A queda acentuada observada quando as soluções encontravam-se em meio alcalino (pH 8), indica ser este o ponto aonde a MP exibe o seu melhor poder emulsificante, pois os resultados de estabilidade mostraram-se mais próximos daqueles encontrados para o emulsificante comercial usado como padrão de alta emulsificação. Em um pH extremamente alcalino (pH 11), a molécula de MP torna-se menos eficaz para estabilizar emulsões, embora ainda proporcione boas propriedades emulsificantes.

Emulsões produzidas a partir de bioemulsificante extraído da parede celular de diferentes leveduras e através de processos de extração distintos não produziram emulsões estáveis em pHs ácidos, obtendo níveis de apenas 72 a 82% de estabilidade entre o pH 4 e 11 (TORABIZADEH et al., 1996; LUKONDEH et al., 2003).

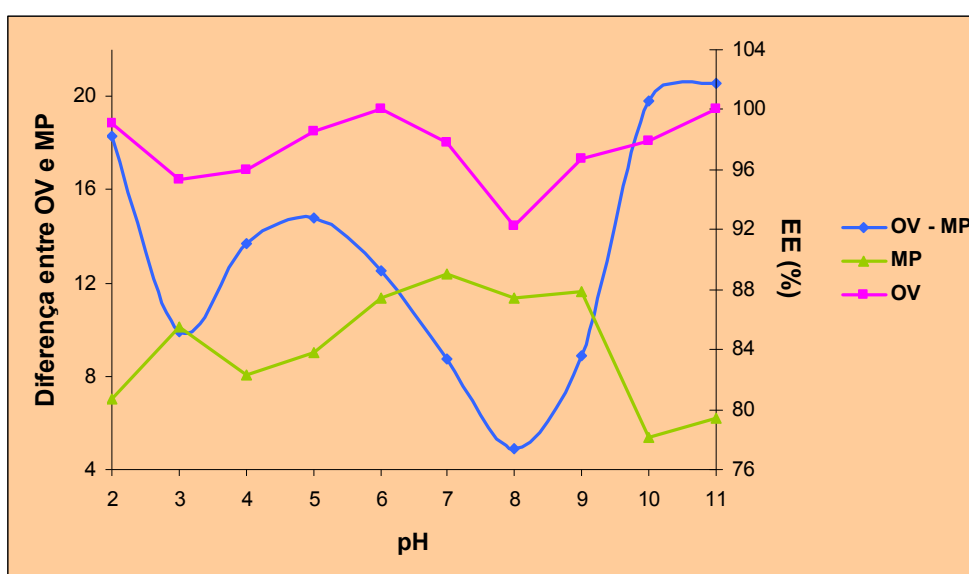


Figura 6 – Diferença (OV-MP) entre os valores de estabilidade de emulsões de manoproteína (MP) e ovalbumina (OV) armazenadas durante 30 dias à 4 °C em diferentes pHs

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, quando submetido à diferentes condições de pH e concentrações de NaCl, o bioemulsificante extraído da parede celular da levedura de cervejaria *S. uvarum* forma emulsões estáveis em soluções contendo água e óleo sobre uma ampla gama de condições físicas e químicas, podendo ter aplicações comerciais na produção de alimentos como maioneses, bolos, sorvetes, além de produtos cárneos como salsichas, entre outros, além na indústria de cosméticos, desempenhando importante papel na formação de consistência e textura (BARRIGA et al., 1999; LUKONDEH et al., 2003).

Desta forma, manoproteínas estruturais extraídas da parede celular de leveduras podem ser utilizadas como efetivos bioemulsificantes, pois exibem em sua estrutura uma grande fração de manose (aproximadamente 90%) e uma menor quantidade de proteínas (4 a 6%), ambos compostos considerados necessários para sua ação como emulsificante (FREIMUND et al., 2003). Assim, a presença de polímeros hidrofílicos de manose aumentam a viscosidade da fase contínua retardando o movimento dos glóbulos de gordura e, conseqüentemente, melhorando a estabilidade da emulsão. Além disso, são covalentemente ligados à cadeia de proteína, mantendo-as na interface, fornecendo à molécula de MP uma estrutura anfipática comum em agentes tensoativos, melhorando sua eficácia como um efetivo emulsificante (BARRIGA et al., 1999; LUKONDEH et al., 2003).

Segundo Costa (2008), proteínas de baixo peso molecular atuam na tensão superficial enquanto aquelas de alto peso molecular estabilizam emulsões. O peso intermediário observado para a fração protéica da MP (Figura 4) sugere que essa molécula apresenta características de bioemulsificante, com capacidade tanto de reduzir a tensão superficial, como biossurfactantes, quanto de formar emulsões com boa estabilidade e alta viscosidade (CAMERON, 1992; COSTA, 2008).

5.4 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

Como já foi mencionado anteriormente, as manoproteínas são moléculas complexas e multifuncionais encontradas na parede celular de leveduras, compostas de polissacarídeos e proteínas em sua estrutura. Devido a essas

moléculas formarem a camada mais externa da parede celular de leveduras, células fagocíticas do hospedeiro reconhecem primeiramente esses carboidratos através de receptores específicos, desencadeando a fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios (TADA et al., 2002; TORRECILLAS et al., 2007). Esses polímeros podem ser reconhecidos tanto pelos receptores de manose (MR) encontrados na superfície de macrófagos e células dendríticas, como através dos receptores CD14 e TLR4 expressos em algumas células fagocíticas (TADA et al., 2002; FERNÁNDEZ et al., 2005). Além disso, as manoproteínas também são capazes de ativar a cascata do sistema complemento através do estímulo à lectina ligadora de manose (MB-lectina), proteína presente no soro responsável pela ligação aos patógenos e eliminação da infecção (TADA et al., 2002; TORRECILLAS et al., 2007).

A parte protéica da MP é reconhecida por células T que são importantes moduladoras da resposta imune do hospedeiro e podem levar a ativação tanto da resposta imune humoral quanto da celular (MENCACCI et al., 1994; PITZURRA et al., 2003; LIBJAKOVÁ et al., 2007). A ação imunomoduladora da MP provavelmente requer a presença de receptores de manose nas células apresentadoras de antígenos do sistema imune (HUFFNAGLE; DEEPE, 2003).

5.4.1 Atividade Cicatrizante da Manoproteína

Devido à atividade imunomoduladora da MP, foi investigada a sua atividade cicatrizante pelo acompanhamento da cicatrização de feridas cirúrgicas nos testículos direito e esquerdo de suínos devido à castração. Os resultados obtidos estão expressos na tabela a seguir:

Tabela 5 – Média do tamanho das feridas nos testículos direito (Td) e esquerdo (Te) obtidas nos diferentes dias de avaliação de acordo com os tratamentos

Tratamentos	Nº dados ¹	x	
		Te (mm)	Td (mm)
Manoproteína (2%)	96	11,61	11,03
Controle	88	11,64	10,50
Efeito	-	NS ²	NS ²
Média Geral ³	184	11,63	10,76
Coefficiente de variação (%)		13,47	13,77

¹ Quantidade de valores medidos para cada testículo durante o experimento

² Não significativo ao nível de 5%

³ Média dos diferentes tratamentos para Te e Td

De acordo com os resultados pode-se verificar que não houve diferenças significativas entre os tratamentos sobre o tamanho das feridas nos testículos direito e esquerdo, o que demonstra uma ação cicatrizante da MP em níveis idênticos aos obtidos pelo produto comercial utilizado rotineiramente na castração dos suínos.

Embora não tenha sido observada interação significativa entre os tratamentos e os dias de avaliação, nas Figuras 7 e 8 é apresentado a evolução do tamanho das feridas em função dos dias de avaliação para cada tratamento.

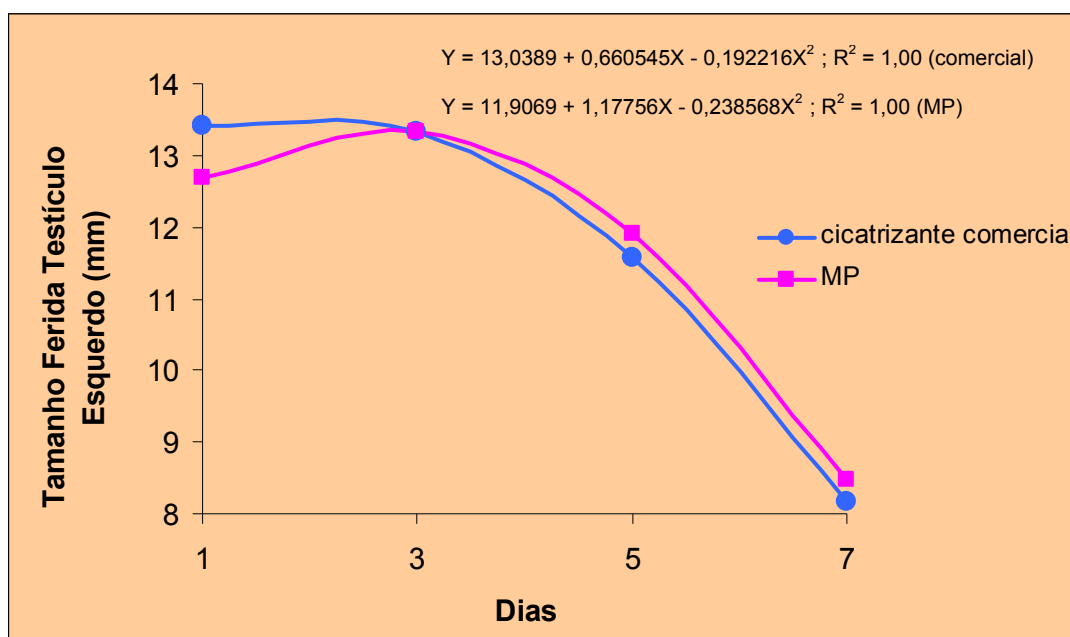


Figura 7 – Redução do tamanho da ferida do testículo esquerdo de suínos nos diferentes dias de avaliação (1, 3, 5 e 7) para os tratamentos controle e manoproteína (MP)

Na Figura 7 observa-se que houve redução visível das feridas do testículo esquerdo nos dois tratamentos durante os sete dias de avaliação, embora os animais tratados com MP tenham apresentado ligeiro aumento no tamanho dos cortes entre os dias 1 e 3, embora não significativo. Esse aumento pode estar relacionado com a fase de inflamação da cicatrização que se inicia no momento da incisão durando cerca de 72 horas, podendo ter a formação de edemas, calor, vermelhidão e dor no local da ferida. Este processo deve-se a um aumento na permeabilidade vascular com passagem de elementos sanguíneos, como plasma e eritrócitos, e células do sistema imunológico para o local da ferida, além de mediadores celulares responsáveis pelos fenômenos inflamatórios.

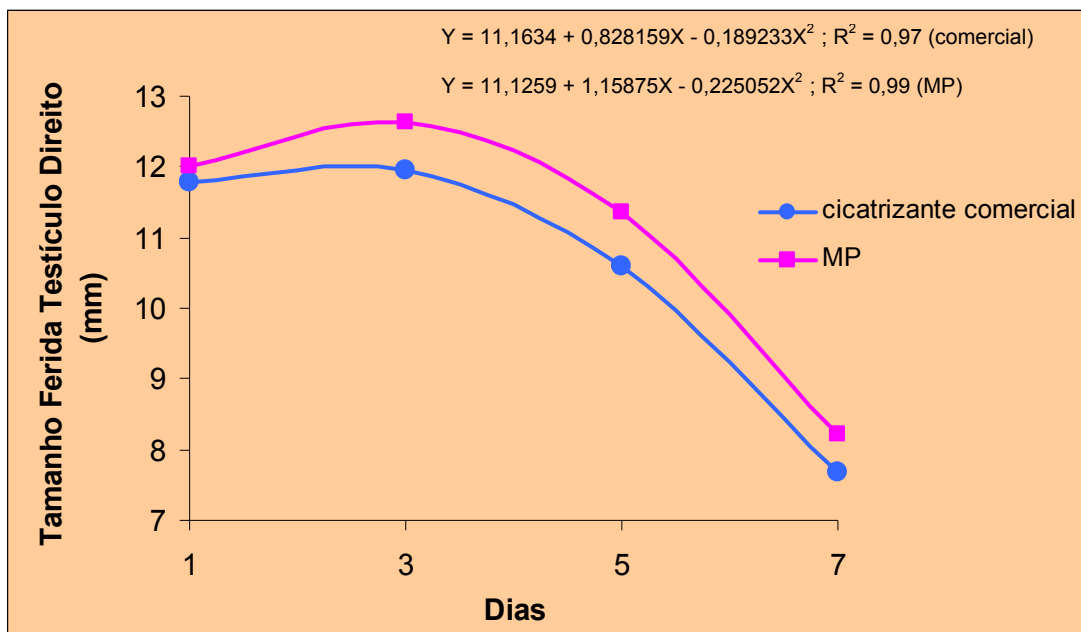


Figura 8 – Redução do tamanho da ferida do testículo direito de suínos nos diferentes dias de avaliação (1, 3, 5 e 7) para os tratamentos controle e manoproteína (MP)

Na Figura 8 observa-se que houve também uma redução visível das feridas do testículo direito nos dois tratamentos durante os sete dias de avaliação, com ligeiro aumento no tamanho dos cortes para os dois tratamentos entre os dias 1 e 3, o que pode ser explicado pelo início da inflamação.

Sabe-se que polissacarídeos são biomoléculas naturais capazes de realizar uma série de funções nos organismos vivos, principalmente devido aos

diversos arranjos moleculares que podem ser encontrados, como a diferente composição de monossacarídeos e cargas, além do grau de ramificação. Desta forma, as moléculas de polissacarídeos possuem habilidade de se associar com outras macromoléculas, incluindo aquelas de superfície celular, o qual é o fator dominante na determinação de sua atividade biológica e da melhora na cicatrização observada no tratamento de feridas (LLOYD et al., 1998).

O processo de cicatrização ocorre em algumas etapas, iniciando imediatamente após o surgimento da ferida com a formação de coágulo, fornecendo uma matriz provisória, além de uma complexa liberação de produtos e mediadores químicos. Em seguida, na fase de inflamação, células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos são recrutadas, as quais agem na destruição de microrganismos. A fase de proliferação caracteriza-se pelo fechamento da lesão, ou reepitalização, com migração de queratinócitos, formação de novos vasos sanguíneos e do tecido de granulação, o qual depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz, pois produz colágeno, elastina, fibronectina e outras substâncias responsáveis pelo remodelamento fisiológico. Por fim, há a contração da área da ferida e a remodelação, com aumento da força de tensão e redução do tamanho da cicatriz e eritema (MANDELBAUM et al., 2003).

Estudos recentes indicam que a aplicação tópica de frações da parede celular de leveduras, como as β -glucanas, pode induzir a uma rápida reparação de feridas experimentais, e este efeito pode ser atribuído à estimulação de células linfo-reticulares do sistema de defesa dos mamíferos, incluindo células endoteliais, reticulares e macrófagos (LLOYD et al., 1998). De acordo com Brenda et al. (1995), incisões de pele tratadas com solução contendo 1% de glucanas apresentaram maior deposição de colágeno após 49 dias devido, principalmente, a ativação de macrófagos, os quais liberam mediadores químicos que atraem fibroblastos para o local da ferida iniciando a secreção de fibras de colágeno.

Extrato alcoólico de leveduras de panificação (10%) foi aplicado sobre perfurações na membrana timpânica em ratos, nos três primeiros dias após as lesões, e os resultados de cicatrização dessas feridas foram idênticos àqueles apresentados pelo uso do fator de crescimento de fibroblasto utilizado como controle positivo (GOLDMAN et al., 1997). Assim, alguns autores afirmam que esses derivados de células de levedura contêm fatores que podem promover o crescimento de leveduras tão bem como de células animais, acelerando a

reepitelização (GOLDMAN et al., 1997; TSAI et al., 2006). Desta forma, estes extratos alcoólicos têm sido amplamente utilizados em cosméticos para tratamentos de clareamento e anti-idades, além de serem empregados na assistência à saúde para redução dos sintomas de queimaduras, feridas e no tratamento de hemorróidas (TSAI et al., 2006).

5.4.2 Avaliação da Resposta Imune Humoral

Os resultados obtidos no experimento piloto não mostraram diferenças estatísticas entre os valores de imunoglobulinas produzidos pelos animais tratados sete dias após a inoculação das amostras, como pode ser observado pela Tabela 6. Os animais do grupo controle negativo, não inoculado com hemácia de carneiro, não foram encontrados anticorpos específicos em níveis detectáveis. Por outro lado, os tratamentos de 100 e 1000 µg de MP mostraram uma tendência em estimular uma maior produção de IgG específicas na resposta imune primária, sendo essas quantidades utilizadas como base para os experimentos seguintes sobre imunomodulação.

Tabela 6 – Título de imunoglobulinas totais (IgTotais), IgM e IgG de camundongos que receberam manoproteína (MP) em diferentes quantidades pela via intraperitoneal no dia 7 de experimento

Tratamentos	IgTotais	IgM	IgG
Controle negativo ¹	-	-	-
Controle positivo	3,33 ± 0,8*	3,17 ± 1,0*	0,17 ± 0,4*
10µg MP	3,83 ± 0,8*	3,50 ± 0,5*	0,33 ± 0,8*
100 µg MP	3,33 ± 1,6*	2,00 ± 1,5*	1,33 ± 1,8*
1000 µg MP	4,17 ± 1,7*	2,33 ± 1,0*	1,83 ± 2,1*

* Não significativo ao nível de 5%

¹ níveis não detectáveis de anticorpos

A seguir, para avaliar a ação imunomoduladora e adjuvante da MP sobre a resposta imune humoral de camundongos, os animais foram tratados antes ou no momento da inoculação do antígeno, e os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela a seguir:

Tabela 7 – Título de imunoglobulinas totais (IgTotal), IgM e IgG de camundongos que receberam manoproteína em diferentes quantidades pela via intraperitoneal nos dias 7 e 35 de experimento

Tratamentos	7 dias			35 dias		
	IgTotais	IgM	IgG	IgT	IgM	IgG
A	3,67 ± 1,5 ^a	2,33 ± 1,2*	1,33 ± 1,2*	7,33 ± 0,8 ^a	1,17 ± 0,7*	6,17 ± 1,4 ^a
B	4,33 ± 0,5 ^{ab}	3,17 ± 0,7*	1,17 ± 1,1*	9,17 ± 0,4 ^b	1,83 ± 0,4*	7,33 ± 0,5 ^{ab}
C	5,50 ± 0,8 ^b	2,83 ± 0,7*	2,67 ± 0,5*	9,33 ± 0,8 ^b	1,67 ± 0,5*	7,67 ± 0,8 ^b
D	4,67 ± 0,5 ^{ab}	2,50 ± 0,5*	2,17 ± 0,9*	8,83 ± 0,4 ^b	1,50 ± 0,5*	7,33 ± 0,5 ^{ab}
E	5,50 ± 0,5 ^b	3,50 ± 1,3*	2,00 ± 1,6*	9,67 ± 0,5 ^b	1,50 ± 0,5*	8,17 ± 0,4 ^b

A = controle positivo; B = 1000µg manoproteína; C = 100µg manoproteína; D = 100µg manoproteína inoculados 6 horas antes do desafio; E = 100µg manoproteína inoculados 24 horas antes do desafio

* Não significativo ao nível de 5%

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%

De acordo com os resultados pode-se verificar que apenas o título de anticorpos totais (IgTotais) diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos na resposta imune primária, ou seja, após sete dias do primeiro desafio com hemácia de carneiro, aonde os animais do grupo C, inoculados com solução contendo 100µg de MP ao mesmo tempo do antígeno, e do grupo E que receberam essa mesma quantidade do polímero 24 horas antes do desafio com o antígeno, foram os que apresentaram níveis mais elevados de imunoglobulinas em relação aos demais tratamentos, diferindo significativamente do grupo controle positivo (tratamento A). Como esperado, observa-se nesta fase uma maior produção de anticorpos da classe IgM para todos os tratamentos quando comparados àqueles da classe IgG.

Já na resposta imune secundária, ou seja, no dia 35 do experimento, os títulos de IgTotais e IgG diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Todos os grupos tratados com MP apresentaram, nesta fase, resposta similar na produção de IgTotais e mais elevada em relação àquela encontrada para o controle positivo. Com relação à produção de IgG, novamente os animais tratados dos grupos C e E apresentaram níveis mais elevados de anticorpos em relação aos demais tratamentos, diferindo do grupo controle que apresentou a menor produção de anticorpos. Como esperado, pode-se observar nesta fase uma maior produção de anticorpos da classe IgG para todos os tratamentos quando comparados àqueles da classe IgM.

Garner e Domer (1994) observaram que camundongos tratados com MP pela via intravenosa 24 horas antes ou durante o desafio com células viáveis de *C. albicans* desenvolvem imunossupressão, como observado pela significativa redução nos níveis de hipersensibilidade tardia e linfoproliferação, porém sem influenciar o desenvolvimento ou expressão da imunidade protetiva nesses animais. Desta forma, é interessante observar que a supressão da resposta imune celular está normalmente associada a um aumento da resposta imune humoral no hospedeiro, devido à ausência da produção de citocinas que irão inibir a ação de linfócitos Th2 (PIETRELLA, et al., 2004).

Quando comparados os níveis de imunoglobulinas produzidos entre os dias 7 e 35 de experimento, todos os tratamentos mostraram diferenças significativas para IgTotais, IgM e IgG (Figura 9) com exceção do grupo controle positivo, o qual não apresentou níveis diferentes no título de IgM durante o período experimental observado ($p > 0,05$). Entretanto, nos demais tratamentos houve uma redução significativa no título de IgM após a segunda imunização, aos 35 dias de experimento, e aumento no título de IgG e IgTotais para todos os tratamentos. Isto se deve à IgM ser a principal responsável pela defesa imunológica na resposta primária, ou seja, quando o hospedeiro tem seu primeiro contato com um antígeno. Posteriormente, este número tende a reduzir e, após novamente sensibilizado pelo antígeno, o organismo inicia uma resposta mais específica a qual é obtida em razão de uma memória imunológica. Nesta fase, há um rápido aumento na produção de IgG específica que é responsável pela elevação do nível de IgTotais, os quais formam a principal classe de anticorpo sérico produzido na resposta secundária e está relacionada com a maturação de anticorpos.

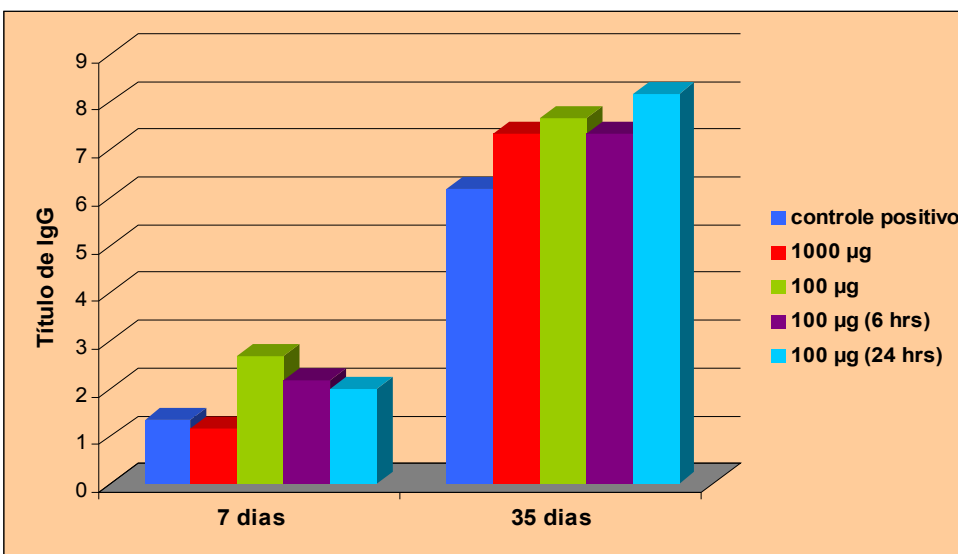
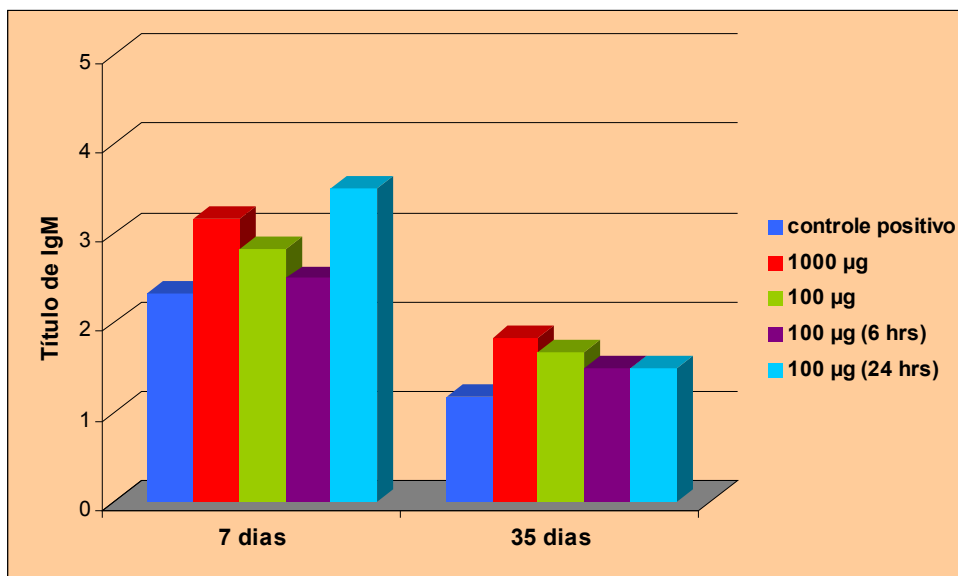
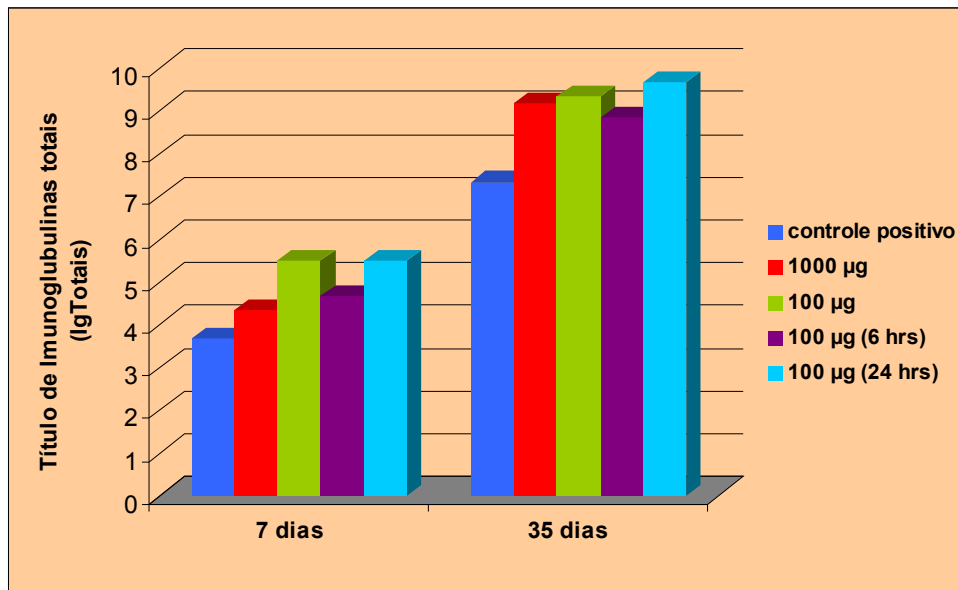


Figura 9 – Diferença no título de imunoglobulinas totais (IgTotais), IgM e IgG de camundongos tratados com diferentes níveis de manoproteína produzidos entre os dias 7 e 35 de experimento

Esses resultados corroboram com aqueles encontrados por Paulovičová et al. (2005), que utilizaram mananas de parede celular de *S. cerevisiae* conjugada à albumina de soro humano para avaliar sua imunogenicidade em camundongos através de três aplicações subcutâneas de 100 µL desse conjugado, contendo 2,5 µg de sacarídeos, em intervalos de duas semanas. Os resultados obtidos mostraram que havia níveis detectáveis de IgM na fase pré-imune dos animais, com ligeiro aumento após a primeira e segunda aplicações do conjugado, ainda que não significativa. Este nível foi reduzido após a terceira imunização, embora sempre com títulos mais elevados quando comparado ao controle positivo, ou seja, soro hiperimune de animais injetados com 200 µL de veículo contendo 10^7 células/L de *S. cerevisiae* inativadas pelo calor. Já para os níveis de IgG, foi observado baixos níveis na fase pré-imune, com aumento significativo principalmente após a segunda e terceira aplicações de manana e em relação ao controle positivo, indicando que esses sacarídeos induzem respostas de células T dependentes, com a ajuda da molécula de proteína, estendendo a memória imunológica através de células B específicas, com efetiva inativação e eliminação dos agentes infecciosos.

Resultados semelhantes também foram apresentados por Ferket et al. (2002), aonde perus fêmea alimentadas com dietas contendo mananoligossacarídeos mostraram níveis mais elevados de IgM em relação à IgG na resposta imune primária, 7 a 14 dias após o primeiro desafio, com inversão desses resultados uma semana após a segunda injeção do desafio. Além disso, galinhas alimentadas com dietas suplementadas com 0,1% desses polissacarídeos apresentaram significativa melhora na imunidade primária e secundária dos animais, além de terem contribuído com a elevação no título de anticorpos na resposta secundária quando adicionado à dieta juntamente com moléculas de proteína, já que estas são reconhecidas pelas células T do hospedeiro (HASSAN; RAGAB, 2007). Desta forma, esses polissacarídeos de parede celular de leveduras, assim como as manoproteínas de *S. uvarum*, possuem ação imunomoduladora sobre a resposta imune humoral do hospedeiro, capazes de ativar tanto uma resposta imune primária como a secundária, após um segundo desafio, com a produção de anticorpos específicos em virtude da memória imunológica.

Muitos estudos têm relatado a presença de anticorpos no soro de animais alimentados com oligossacarídeos de manose e sua resposta protetora na

melhora da resistência a doenças. Isto se deve principalmente à habilidade dessas moléculas em bloquear os sítios de ataque de bactérias enteropatogênicas à mucosa intestinal através de sua ligação a esses receptores (SANTIN et al., 2001; NOLLET et al., 2007; TORRECILLAS et al., 2007). Além disso, porções desses polissacarídeos de parede celular podem provocar propriedades antigênicas na mucosa intestinal ativando o sistema imune inato através de receptores específicos à manose em células presentes no trato gastrointestinal (FERKET et al., 2002; TORRECILLAS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Em frangos de corte alimentados com dieta suplementada de oligossacarídeos de parede celular de *S. cerevisiae*, a melhora na performance desses animais pode estar atribuída ao desenvolvimento da resposta imune na mucosa intestinal (SANTIN et al., 2001; FERKET et al., 2002). Desta forma, as moléculas agem na destruição e eliminação de patógenos com manutenção da microflora intestinal, permitindo uma melhor digestão e absorção de nutrientes, o que pode ser observado através do desenvolvimento na morfologia das vilosidades do intestino (SANTIN et al., 2001; HASSAN; RAGAB, 2007). Esses oligossacarídeos também são capazes de estimular a produção de IgA da mucosa intestinal, além de aumentar o número de linfócitos e leucócitos em tecidos linfóides associados (OLIVEIRA et al., 2009).

A estimulação da resposta imune humoral específica também foi reportada por Oliveira et al. (2009), aonde frangos de corte que receberam dietas contendo mananoligossacarídeos (MOS) de parede celular de *S. cerevisiae* apresentaram aumento no título de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle e contra o vírus da doença bursal infecciosa. Esta imunoestimulação pode ser importante uma vez que os anticorpos produzidos pelas galinhas podem passar para a progênie (SHASHIDHARA; DEVEGOWDA, 2003). A administração oral de MOS também foi eficaz no aumento do título de IgA na mucosa intestinal de ratos após 18 e 32 dias de tratamento, e do nível de IgG circulatório específico em cachorros vacinados durante monitoramento de 9 semanas, embora sem diferenças significativas com o grupo controle (O'CARRA, 1998). Desta forma, observa-se que manoproteínas e polissacarídeos extraídos da parede celular de diferentes leveduras possuem a habilidade de estimular a produção de anticorpos tanto pela administração oral ou através da aplicação intraperitoneal, devido a ligação à receptores presentes na superfície de células imunes do hospedeiro.

O'Carra (1998) demonstrou também que leveduras obtidas a partir de diferentes condições ambientais, como mudanças de temperatura e meio de crescimento, podem sofrer alterações na estrutura da parede celular, alterando sua habilidade em estimular a resposta imune com produção de diferentes níveis de IgA intestinais. Assim, a elevação no título desses anticorpos foi observada a partir da parede celular de leveduras obtidas em altas temperaturas, o que pode ter resultado na produção de proteínas termoestáveis, como as manoproteínas.

Através da produção de anticorpos observada pela aplicação intraperitoneal de MP, pode-se esperar uma ativação e aumento no número de leucócitos nos tecidos linfóides o qual foi avaliado pelo peso do timo, baço e fígado dos animais após o período experimental de 35 dias, e os resultados podem ser observados na tabela a seguir.

Tabela 8 – Peso dos órgãos de camundongos tratados com diferentes níveis de manoproteína pela via intraperitoneal ao final dos 35 dias de experimento

Tratamentos	Timo (g)	Baço (g)	Fígado (g)
A	0,064 ± 0,02*	0,110 ± 0,01*	1,923 ± 0,22*
B	0,065 ± 0,01*	0,149 ± 0,04*	2,187 ± 0,25*
C	0,058 ± 0,10*	0,171 ± 0,21*	2,338 ± 0,21*
D	0,060 ± 0,02*	0,118 ± 0,05*	2,090 ± 0,41*
E	0,080 ± 0,02*	0,141 ± 0,03*	2,128 ± 0,13*

A = controle positivo; B = 1000µg manoproteína; C = 100µg manoproteína; D = 100µg manoproteína inoculados 6 horas antes do desafio; E = 100µg manoproteína inoculados 24 horas antes do desafio

* Não significativo ao nível de 5% pelo teste de Tukey

De acordo com a Tabela 8, os resultados não mostraram diferenças significativas no peso dos órgãos linfóides entre os tratamentos ao final do período experimental, embora pode-se observar uma tendência no aumento do peso do timo para os animais tratados com 100µg de MP 24 horas antes do desafio (tratamento E), e uma elevação nos valores do baço e fígado para todos os grupos tratados, embora o grupo C, inoculados com 100µg de MP no mesmo instante do desafio, tenha apresentado os maiores valores em relação ao controle positivo. Esses resultados não corroboram com os apresentados por Swamy et al. (2003), aonde em suínos alimentados com dietas contendo uma glicomanana adsorvente e

contaminados com micotoxinas, nenhuma alteração foi observada para o peso do fígado e baço desses animais. Desta forma, observa-se que dietas deficientes em proteína podem reduzir o número de linfócitos nos órgãos linfóides dos animais tratados, já que a resposta imune protetiva requer um suprimento de nutrientes (HASSAN; RAGAB, 2007).

De acordo com Morales-López et al. (2009), frangos alimentados com ração contendo MP na concentração de 95 mg/kg não mostraram aumento significativo no peso do timo e do baço comparados aos demais tratamentos, embora esses valores apresentaram-se mais elevados em relação ao grupo controle e, quando adicionada juntamente com β -glucana, polímero extraído da parede celular da levedura *S. cerevisiae*, o peso do timo foi significativamente maior do que aqueles animais alimentados apenas com a dieta controle. Além disso, a inclusão da MP na dieta dos frangos na concentração de 190 mg/kg de alimento também não mostrou efeito positivo no peso relativo do fígado dos animais. Já em perus alimentados com esse polímero e desafiados com bactéria patogênica, os resultados mostraram animais com aumento significativo do fígado em relação àqueles do tratamento controle, e pequeno inchaço no baço, indicando que esses órgãos desempenham um importante papel na resposta imune inflamatória, além de estarem envolvidos na síntese de proteínas da fase aguda, ativação de linfócitos, produção de anticorpos e amostragem de antígenos (FERKET et al., 2002).

Componentes da parede celular de leveduras, assim como as moléculas de MP extraídas da parede celular de *S. uvarum*, podem estimular o sistema imune do hospedeiro atuando como um antígeno microbiano não patogênico ou como um adjuvante, e estudos com mamíferos têm mostrado sua importância sobre o desenvolvimento de órgãos e tecidos linfóides (MORALES-LÓPEZ et al., 2008).

5.4.3 Quantificação de NO

O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, solúvel, produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios específicos a partir da L-arginina, através de uma reação mediada pela enzima NO-sintase e que atualmente constitui

um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares (SCHROEDER; KUO, 1995; QUEIROZ; BATISTA, 1999; DUSSE et al., 2003; PERES; CURI, 2005). Desta forma, está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo, além de atuar como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais e de constituir um importante mediador citotóxico e citostático de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais, aonde sua citotoxicidade resulta da ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório (DUSSE et al., 2003).

Apesar dos efeitos benéficos observados, o NO pode apresentar efeito prejudicial ao organismo por ser potencialmente tóxico, já que sua ação consiste principalmente na reação com intermediários reativos do oxigênio, originando radicais altamente reativos (DUSSE et al., 2003). Sua determinação laboratorial é complexa, aonde a caracterização de ativadores e inibidores específicos de sua síntese constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças, já que uma grande variedade de doenças pode estar relacionada com um baixo ou alto nível de NO no organismo (QUEIROZ; BATISTA, 1999; DUSSE et al., 2003).

Para a avaliação *in vitro* da resposta imune celular observou-se a capacidade da MP em estimular a produção de NO, com ou sem a adição de LPS, por macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c, e os resultados estão apresentados na tabela a seguir:

Tabela 9 – Quantificação de óxido nítrico, *in vitro*, produzido por macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c estimulados por diferentes concentrações de manoproteína (MP) com ou sem a adição de LPS

MP (µg/mL)	Teor de óxido nítrico (µM)	
	MP	MP + LPS
0	15,73 ± 0,3 ^a	27,40 ± 2,0 ^a
6,125	16,62 ± 0,0 ^{ab}	23,73 ± 0,0 ^{ab}
12,2	16,96 ± 0,5 ^{ab}	21,07 ± 0,0 ^b
25	17,18 ± 0,2 ^{ab}	19,62 ± 2,0 ^b
50	17,73 ± 0,0 ^{ab}	19,29 ± 0,9 ^b
100	19,96 ± 1,6 ^b	19,29 ± 1,3 ^b

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Médias na mesma linha seguidas de números iguais não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5%

De acordo com os resultados pode-se observar que a MP foi capaz de estimular a produção de NO, a qual foi proporcionalmente mais acentuada com o aumento da concentração da molécula, embora tenha diferido significativamente do grupo controle, sem adição de MP (0 $\mu\text{g/mL}$), apenas quando inserida na maior concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

A adição de LPS ao meio causou um aumento significativo na produção de NO em todas as concentrações estudadas, comparadas aos macrófagos tratados apenas com MP, como pode ser observado na Figura 10. Isto se deve ao LPS, componente estrutural integrante da membrana externa de bactérias Gram-negativas, ser uma das mais potentes endotoxinas microbianas iniciadoras de inflamação, capaz de ativar monócitos e macrófagos levando-os à produção de citocinas as quais servem como mediadores endógenos da inflamação através de interações mediadas por receptores com diversas células alvo (DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002).

Contudo, juntamente com o LPS, a MP causou uma redução significativa na produção de NO em todas as concentrações utilizadas quando comparadas ao tratamento controle, com exceção do grupo tratado com o menor nível da glicoproteína (6,125 $\mu\text{g/mL}$, $p > 0,05$), concluindo que altas concentrações de MP podem inibir a produção de NO na presença de outro ativador de macrófagos.

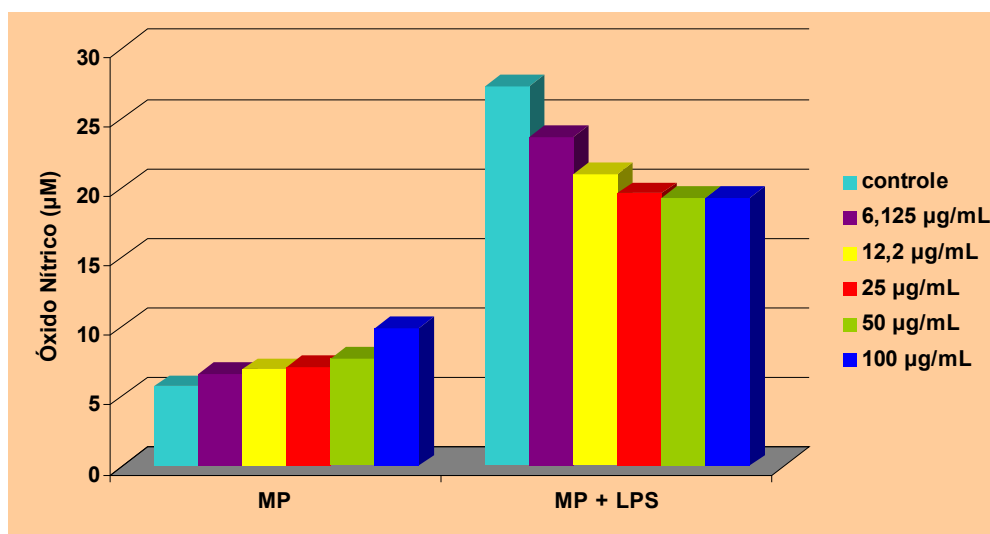


Figura 10 – Teor de óxido nítrico produzido *in vitro* por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com diferentes níveis de manoproteína (MP), com ou sem a adição de LPS

Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Noleto et al. (2004), que avaliaram o efeito de mananas isoladas de leveduras de panificação nas concentrações de 10 - 250 µg/mL sobre macrófagos peritoneais, e os resultados mostraram aumento significativo na produção de NO em todas as concentrações quando comparada ao tratamento controle, sugerindo que este polímero apresenta propriedades como modulador das funções de macrófagos. Entretanto, esses polímeros não foram capazes de modificar a resposta de macrófagos estimulados com LPS ou INF- γ , indicando que a manana de parede celular não pode agir como um co-sinal para a indução da síntese de NO.

Para Jouault et al. (2000), macrófagos incubados com β -1,2-oligomanosídeo, açúcar extraído da fração de fosfopeptideomanana da parede celular de *C. albicans*, tiveram menor produção de NO quando comparados àqueles estimulados somente com LPS. Contudo, em resposta ao estímulo com LPS e ao pré-tratamento com esses polissacarídeos, as células produziram quantidades de NO menores do que o tratamento controle, adicionadas somente de LPS, sugerindo que esse efeito inibitório pode estar relacionado ao tempo de incubação e à concentração da molécula utilizada, com o máximo efeito observado por macrófagos incubados com 50 µg/mL do açúcar. Além disso, essa inibição pode também estar relacionada com a secreção de alguns mediadores por esses macrófagos condicionados.

A avaliação *in vivo* da resposta imune celular foi realizada pela quantificação de NO produzido por macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c e pelo plasma ao final do período experimental de 10 dias, como descrito no item 4.4.5, e os resultados estão apresentados na Tabela 10. O teor de NO obtido de macrófagos peritoneais foi determinado com ou sem a adição de LPS ao meio.

Tabela 10 – Quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais, com ou sem a adição de LPS, e liberados no plasma de camundongos da linhagem BALB/c tratados com manoproteína e PBS (controle)

Tratamentos	Teor de óxido nítrico (μM)	
	Macrófagos Peritoneais	Plasma
PBS	$2,92 \pm 0,3^a$	$6,95 \pm 1,2^*$
PBS + LPS	$3,95 \pm 0,5^a$	-
Manoproteína	$3,52 \pm 0,1^a$	$11,70 \pm 5,8^*$
Manoproteína + LPS	$26,43 \pm 2,2^b$	-

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%

* Não significativo ao nível de 5% pelo teste T de Student

A partir desses dados pode-se observar que a MP não foi eficaz na estimulação de NO *in vivo* por macrófagos obtidos de camundongos tratados ao final do período experimental, assim como somente a adição de LPS ao meio, quando comparados ao grupo controle. Contudo, em resposta ao estímulo de LPS, a MP foi capaz de elevar significativamente o nível de NO produzido pelas células, indicando que a glicoproteína de parede celular pode agir como um co-sinal para a indução da síntese de NO, *in vivo*, após o tratamento dos camundongos durante um período experimental de 10 dias. Além disso, o nível de NO contido no plasma dos animais tratados e do grupo controle não diferiram significativamente ao final do experimento ($p > 0,05$), embora quando tratados com MP foi observada uma tendência ao aumento dos níveis de NO.

Os efeitos de moléculas ativadoras sobre macrófagos em experimentos *in vivo* e *in vitro* são extremamente variados e dependentes do regime de exposição à elas e estudos baseados em modelos *in vivo* são mais complexos devido à resposta do sistema imune sistêmico envolver também mediadores não originados de macrófagos, tais como hormônios e peptídeos neuroprotetivos (DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002).

Algumas pesquisas têm mostrado que polissacarídeos isolados da parede celular de leveduras são identificados como moduladores da resposta biológica devido ao seu potencial, entre outros, de modificar a resposta de macrófagos através da liberação de radicais livres e produção de NO, além de interferir em sua habilidade fagocítica (ATAOĞLU et al., 2000; NOLETO et al.,

2004). Deste modo, MP obtidas a partir da parede celular de leveduras de cervejaria mostraram-se capazes em estimular a liberação de NO, *in vivo*, por macrófagos peritoneais de camundongos, quando adicionadas de LPS, além de ter mostrado uma tendência ao aumento do nível deste radical no plasma desses animais.

5.4.4 Análise Hematológica

Os resultados da análise hematológica podem ser observados nas Tabelas 11 e 12, os quais foram obtidos através de amostras de sangue coletadas dos camundongos ao final dos 10 dias de experimento, como descrito no item 4.4.5.3.

Tabela 11 – Contagem total de plaquetas, hematócrito, contagem de reticulócitos e contagem total de leucócitos do sangue de camundongos da linhagem BALB/c tratados com manoproteína (MP) e PBS (controle) durante um período experimental de 10 dias

Tratamentos	Plaquetas (mm ³)	Hematócrito (%)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (mm ³)
PBS	977.500 ^a	49 ^a	6,2 ^a	5.125*
MP	775.000 ^b	42 ^b	9,5 ^b	6.175*

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5%

* Não significativo ao nível de 5%

De acordo com a Tabela 11, pode-se observar que os animais tratados com MP apresentaram redução significativa do volume globular (hematócrito) e da contagem total de plaquetas, além de um aumento significativo no número de reticulócitos, mantendo a contagem de leucócitos inalterada quando comparados ao grupo controle (PBS).

Esses resultados sugerem que a MP pode estar envolvida na ativação dos macrófagos e na elevação da produção de NO, como descrito anteriormente. Desta forma, há a formação de radicais altamente reativos no

organismo do hospedeiro devido à reação do NO com intermediários reativos do oxigênio, o qual pode agir na membrana das células, provocando lesões nas hemácias, acarretando no aumento da atividade medular e produção de reticulócitos no sangue periférico, os quais são precursores das células vermelhas e suprimem a necessidade do transporte dos gases. Além disso, quando em concentrações elevadas, o NO também pode atuar sobre as plaquetas inibindo sua adesão, ativação e agregação, assim como o recrutamento plaquetário, interferindo na inflamação e hemostasia (VANNI et al., 2007).

Tabela 12 – Contagem diferencial leucocitária obtida do sangue de camundongos da linhagem BALB/c tratados com manoproteína (MP) e PBS (controle) durante um período experimental de 10 dias

Tratamentos	Contagem Diferencial (mm ³)			
	Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
PBS	777 ^a	4.158*	140*	51*
MP	3.394 ^b	2.566*	165*	51*

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste T de Student ao nível de 5%

* Não significativo ao nível de 5%

Os resultados da contagem diferencial leucocitária apresentados na Tabela 12 não indicaram diferenças significativas na contagem de linfócitos, monócitos e eosinófilos entre os dois tratamentos, embora mostrou-se uma elevação significativa de neutrófilos segmentados para os animais tratados com MP, e pode ser explicado devido a atuação desses polissacarídeos sobre essas células através de receptores específicos de manose localizados em sua membrana, levando à sua ativação e migração para o sangue periférico, aperfeiçoando a resposta imune inata dos animais (ISHIDA-OKAWARA et al., 2007)

De acordo com Sang et al. (2009), a suplementação de uma dieta com oligossacarídeos de manana derivados da parede celular de *S. cerevisiae* pode melhorar a capacidade da resistência de lagostas a agentes estressores como o desafio com a bactéria *Vibrio mimicus* ou à exposição ao ar durante a simulação de um transporte, já que neste caso foi observada uma melhora na sobrevivência e na

resposta imune no grupo teste, indicada pela estabilidade ou aumento na contagem total de hemócitos, quando comparada com o grupo controle, o qual apresentou redução no número dessas células. Esse efeito também pode ser observado através da contagem diferencial dos hemócitos, aonde os animais apresentaram aumento no número de células granulares e hialinas após a suplementação. Resultados similares foram encontrados por Sang e Fotedar (2010), aonde obtiveram uma maior contagem total de hemócitos e células granulares na hemolinfa de lagostas alimentadas com dieta suplementada com oligossacarídeos de manana, sete dias após infecção bacteriana, quando comparadas ao grupo controle.

A injeção da molécula de MP no peritônio dos camundongos, utilizada como imunomodulador da resposta imune neste trabalho, não foi capaz de aumentar significativamente a contagem total de leucócitos dos animais, entretanto ela influenciou significativamente na contagem diferencial dessas células, observado com a elevação no número de neutrófilos segmentados, os quais podem ser responsáveis pela melhora da resposta imune inata do hospedeiro. Portanto, o aumento na contagem de células do sistema imunológico observado nos animais após um desafio ou simulação de estresse pode ser explicado pela capacidade de proliferação dessas células, a qual pode triplicar quando o imunoestimulante é injetado diretamente no hospedeiro (SANG et al., 2009).

6 CONCLUSÕES

- A extração da MP a partir da parede celular de *Saccharomyces uvarum* teve um rendimento de 1,76% em relação à massa inicial do creme de levedura (inicial) e 3,87% em relação ao peso total da parede celular;
- A molécula de MP apresentou 0,33% de lipídeos, 2,58% de cinzas, 18,98% de proteínas e 78,11% de carboidratos, sendo esses últimos compostos em sua maior parte por manose, seguido de glicose e uma pequena fração de xilose;
- A fração protéica da MP apresentou peso molecular de aproximadamente 52 kDa, sendo composta principalmente pelos aminoácidos ácido glutâmico, aspártico e serina, além da treonina e lisina que se destacam por serem classificados entre os aminoácidos essenciais;
- As emulsões formadas com a molécula de MP apresentaram elevados valores de atividade emulsificante já quando adicionada em baixas concentrações;
- As emulsões formadas com a molécula de MP também apresentaram elevados valores de estabilidade, com mudanças no pH e adição de NaCl nas soluções, mantendo valores próximos àqueles encontrados para o emulsificante comercial;
- A MP apresentou ação cicatrizante sobre as feridas provocadas pela castração dos suínos em níveis idênticos aos obtidos pelo produto comercial rotineiramente utilizado;
- Camundongos imunizados com MP nas concentrações de 100µg inoculados junto ou 24 horas antes do desafio pela via intraperitoneal, apresentaram os maiores títulos de IgT na resposta imune primária e IgG na resposta secundária, embora todos os tratamentos tenham apresentado aumento significativo no título de IgT uma semana após a segunda imunização;

- Camundongos imunizados com MP apresentaram, em todos os tratamentos, redução no título de IgM e aumento de IgT e IgG após o segundo desafio, com exceção do grupo controle positivo, o qual não apresentou níveis significativamente diferentes no título de IgM durante o período experimental observado;
- Mesmo não significativo, houve uma tendência de aumento de peso do timo para os animais tratados com 100µg de MP 24 horas antes do desafio e uma elevação nos valores do baço e fígado para todos os grupos tratados;
- O teor de óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais *in vitro* foi proporcionalmente maior com o aumento da concentração de MP, embora tenha diferido significativamente do grupo controle apenas quando adicionado no maior nível (100 µg/mL);
- A adição de LPS ao meio causou aumento significativo no teor de NO produzido em todos os tratamentos, embora nos grupos tratados com a MP observou-se uma inibição dessa produção, com exceção do grupo tratado com o menor nível da molécula (6,125 µg/mL);
- A MP não foi eficaz na estimulação de NO, *in vivo*, no plasma e por macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos tratados, com exceção das células adicionadas de LPS;
- Os animais tratados com MP apresentaram redução significativa do volume globular e da contagem total de plaquetas, além de aumento no número de reticulócitos e neutrófilos segmentados no sangue;
- A MP utilizada se mostrou eficiente na estimulação tanto do sistema imune humoral, com a produção de anticorpos, bem como do sistema imune inato de camundongos, indicado pela elevação no teor de NO e a estimulação de células do sistema imunológico.

REFERÊNCIAS

ALVES, F. G. et al. Characterization of White Wine Mannoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6097-6101, 2002.

ATAOĞLU, H. et al. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannans produce fever in rats. Role of nitric oxide and cytokines. **Life Sciences**, v. 67, n. 2247-2256, 2000.

BAPTISTA, A. S. **Saccharomyces cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses**. 2001. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BARRIGA, J. A. T. et al. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 96-102, 1999.

BRENDA, E. et al. Action of papain, sugar, minoxidil, and glucan on excisional wounds in rats. **Current therapeutic research**, v. 56, n. 12, p. 1285-1297, 1995.

CAMERON, D. R. **Identification and characterization of mannoprotein emulsifier from baker's yeast**. Thesis s (Philosophy Doctor's degree) - McGill University ,Montreal, 1992.

CASANOVA, M. et al. Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 11, p. 4898-4906, 1992.

CID, V. J. et al. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 345-386, 1995.

CHALIER, P. et al. Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food Chemistry**, v. 100, p. 22-30, 2007.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 369-379, 2006.

CORBACHO, I.; OLIVERO, I.; HERNÁNDEZ, L. M. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 773-790, 2005.

COSTA, A. G. **Determinação das melhores condições de extração de manoproteínas da parede celular de leveduras e sua aplicação**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

DÍAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on reproductive performance and serum chemistry of pregnant gilts. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2361-2366, 2009.

DRÁBIKOVÁ, K. et al. Glucomannan reduces neutrophil free radical production *in vitro* and in rats with adjuvant arthritis. **Pharmacological Research**, 2009.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 903-914, 2002.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FAO/WHO. Protein quality evaluation; report of the joint FAO/WHO expert consultation. Food and Nutrition Paper, n. 51. **Food and Agriculture Organizations and the World Health Organization**, Rome, Italy, 1989.

FERNÁNDEZ, N. et al. Mannose-containing molecular patterns are strong inducers of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human macrophages. **The Journal of Immunology**, 2005.

FERKET, P. R.; PARKS, C. W.; GRIMES, J. L. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. **Multi-State Poultry Meeting**, p. 14-16, maio 2002.

FREIMUND, S. et al. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 159-171, 2003.

FUKUDA, E. K. et al. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GARNER, R. E.; DOMER, J. E. Lack of effect of *Candida albicans* mannan on development of protective immune responses in experimental murine candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 2, p. 738-741, 1994.

GOLDMAN, S. A. et al. The effect of acidic fibroblast growth factor and live yeast cell derivative on tympanic membrane regeneration in a rat model. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 117, n. 6, p. 616-621, 1997.

GOMEZ, M. J. et al. Purification and Biochemical Characterization of a 65-Kilodalton Mannoprotein (MP65), a Main Target of Anti-*Candida* Cell-Mediated Immune Responses in Human. **Infection and immunity**, v. 64, n. 7, p. 2577-2584, 1996.

GOMEZ, M. J. et al. Biochemical and immunological characterization of MP65, a major mannoprotein antigen of the opportunistic human pathogen *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 694-701, 2000.

GONÇALVES, F. et al. Characterization of White Wine Mannoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6097-6101, 2002.

HASSAN, H. A.; RAGAB, M. S. Single and combined effects of mannan oligosaccharide (mos) and dietary protein on the performance and immunity response of laying hens. **Egyptian Poultry Science**, v. 27, p. 969-987, 2007.

HUFFNAGLE, G. B.; DEEPE, G. S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 344-350, 2003.

ISHIDA-OKAWARA, A. et al. Neutrophil activation and arteritis induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 82, p. 220-226, 2007.

JOUAULT, T.; FRADIN, C.; TRINEL, P-A.; POULAIN, D. *Candida albicans*-Derived b-1,2-Linked Mannooligosaccharides Induce Desensitization of Macrophages. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 965–968, 2000.

KAPTEIN, J. C. et al. Covalent association of β -1,3-glucan with β -1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 13, p. 3788-3792, 1995.

KAPTEYN, J. C. et al. Altered extent of cross-linking of β 1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β 1,3 glucan content. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 20, p. 6279-6284, 1997.

KLIS, F. M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, 2007.

KRIŽKOVÁ, L. et al. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell mannans in vitro. **Mutation Research**, v. 497, p. 213-222, 2001.

LEHLE, L. Biosynthesis of the core region of yeast mannoproteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 589-601, 1980.

LESAGE, G.; BUSSEY, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 317-343, 2006.

LIBJAKOVÁ, L. et al. Evaluation of different mannan polysaccharide usage in enzyme-linked immunosorbent assay for specific antibodies determination. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 521-525, 2007.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LIU, X. Y. et al. A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 239-247, 2008.

LLOYD, L. L. et al. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 315–322, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 715-720, 2003.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MALVEZI, A. D. **Papel do óxido nítrico e do TNF- α na anemia e no estresse oxidativo em hemácias de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção por *T. cruzi* (Cepa γ)**. 2003. Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Patologia Experimental (Laboratório de Imunopatologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

MARTÍNEZ, J. P. et al. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 121-141, 1998.

MENCACCI, A. et al. A Mannoprotein Constituent of *Candida albicans* that elicits different levels of delayed-type hypersensitivity, cytokine production, and anticandidal protection in mice. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5353-5360, 1994.

MORALES-LÓPEZ, R. et al. Use of yeast cell walls; β -1, 3/1, 6-glucans; and mannoproteins in broiler chicken diets. **Poultry Science**, v. 88, p. 601-607, 2009.

MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação da composição de biopolímeros por cromatografia em camada delgada: Metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 222-224, 1998.

MOUKADIRI, I.; JAAFAR, L.; ZUECO, J. Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae mnn1 mnn9* double mutant by reducing agents. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4741-4745, 1999.

MPOFU, C. M. et al. Microbial Mannan Inhibits Bacterial Killing by Macrophages: A Possible Pathogenic Mechanism for Crohn's Disease. **Gastroenterology**, v. 133, n. 5, p. 1487-1498, 2007.

NAKAJIMA, T.; BALLOU, C. E. Characterization of the Carbohydrate Fragments Obtained from *Saccharomyces cerevisiae* Mannan by Alkaline Degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 23, p. 7679-7684, 1974.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. A.; BENAYAS, C. G.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679 – 681, 1998.

NOLETO, G. R. et al. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and their effect on peritoneal macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 113-122, 2004.

NOLLET, L.; HUYGHEBAERT, G.; SPRING, P. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide (Bio-Mos) on Live Performance of Broiler Chickens Given an Anticoccidial Vaccine (Paracox) Followed by a Mild Coccidial Challenge. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, p. 397-403, 2007

O’CARRA, R. Boosting Immune Response in Dogs: a Role for Dietary Mannan Sugars. Biotechnology in the feed industry. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM: PASSPORT TO THE YEAR 2000., 14, 1998. **Proceedings...** p. 563-572, 1998.

OLIVEIRA, M. C. et al. Effect of mannanoligosaccharides and/or enzymes on antibody titers against infectious bursal and Newcastle disease viruses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 6-11, 2009.

PANIS, C. **Papel antagônico das isoformas óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e induzida (iNOS) em camundongos nocautes para 5-lipoxigenase infectados com *Trypanosoma cruzi***. 2009. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina , Londrina, 2009.

PAULOVÍČOVÁ, E. et al. Immune response to *Saccharomyces cerevisiae* mannan conjugate in mice. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 1693-1698, 2005.

PEPPLER, H. J. Food Yeasts. In: ROSE, A. H. (ed.). **The Yeasts**. London and New York: Academic Press, 1970. v. 3, p. 421-462.

PERES, C. M.; CURTI, R. **Como cultivar células**. Guanabara Koogan, 2005.

PIETRELLA, D. et al. An early imbalance of interleukin 12 influences the adjuvant effect of mannoproteins of *Cryptococcus neoformans*, **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 883-891, 2004.

PITZURRA, L. et al. Humoral response against *Cryptococcus neoformans* mannoprotein antigens in HIV-infected patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 133, p. 91-96, 2003.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 584-590, 1999.

SANG, H. M.; KY, L. T.; FOTEDAR, R. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide improves the immune responses and survival of marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912) when challenged with different stressors. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, p. 341-348, 2009.

SANG, H. M.; FOTEDAR, R. Effects of mannan oligosaccharide dietary supplementation on performances of the tropical spiny lobsters juvenile (*Panulirus ornatus*, Fabricius 1798). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, p. 483-489, 2010.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, p. 236-244, 2001.

SCHROEDER, R. A.; KUO, P. C. Nitric Oxide: Physiology and Pharmacology. **Anesthesia & Analgesia**, v. 81, p. 1052-1959, 1995.

SGARBIERI, V. C. et al. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces sp.*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1/2, p. 119-125, 1999.

SHASHIDHARA, R. G.; DEVEGOWDA, G. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide on Broiler Breeder Production Traits and Immunity. **Poultry Science**, v. 82, p. 1319-1325, 2003.

SHEPHERD, R. et al. A novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995.

SUPHANTHARIKA, M. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 55-60, 2003.

SWAMY, H. V. L. N. et al. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2792-2803, 2003.

TADA, H. et al. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*- derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 7, p. 503-512, 2002.

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S. A.; TEHRANI, H. A. Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. **Lebensm.-Wiss. u.-Technology**, v. 29, p. 734-737, 1996.

TORRECILLAS, S. et al. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 969-981, 2007.

TOWBIN, H.; GORDON, J. Immunoblotting and dot immunobinding: Current status and outlook. **Journal of Immunological Methods**, v. 72, n. 2, p. 313-340, 1984.

TSAI, H. H. et al. Inhibition of inflammatory nitric oxide production and epidermis damages by *Saccharomycopsis* Ferment Filtrate. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, p. 249-257, 2006.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n. 4, p. 523-533, 2000.

VANNI, D. S. et al. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 181-189, 2007.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIN, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista Nutrição**, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000a.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIN, I. D. Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. **Revista Nutrição**, v. 13, n. 2, p. 127-134, 2000b.

WANG, Y. et al. Cytokine involvement in immunomodulatory activity affected by *Candida albicans* mannan. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1384-1391, 1998.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; KRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, p. 170-177, 1986.

YAMADA, E. A. et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.

YAMADA, E. A.; SGARBIERI, V. C. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Protein Concentrate: Preparation, Chemical Composition, and Nutritional and Functional Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3931-3936, 2005.