



**DANIELLE DOS SANTOS CINELLI PINTO**

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE RUMINAL DE  
DIFERENTES PRODUTOS DE BETAGLUCANA EXTRAÍDOS  
DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA SUBSIDIAR SEU  
USO COMO IMUNOFÁRMACO**

**LAVRAS - MG**

**2023**

**DANIELLE DOS SANTOS CINELLI PINTO**

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE RUMINAL DE DIFERENTES PRODUTOS DE  
BETAGLUCANA EXTRAÍDOS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA  
SUBSIDIAR SEU USO COMO IMUNOFÁRMACO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias, área de concentração em  
Fisiologia e Metabolismo Animal, para obtenção do título  
de Mestre.

Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão

Orientador

Prof. Dr. Marcos Ferrante

Prof. Dr. Marcelo Porto Bemquerer

Coorientadores

**LAVRAS - MG**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pinto, Danielle dos Santos Cinelli.

Avaliação da estabilidade ruminal de diferentes produtos de betaglucana extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* para subsidiar seu uso como imunofármaco / Danielle dos Santos Cinelli Pinto. - 2023.

86 p. : il.

Orientador(a): Humberto de Mello Brandão.

Coorientador(a): Marcos Ferrante, Marcelo Porto Bemquerer.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Biopolímero. 2. Imunomodulação. 3. Resistência antimicrobiana. I. Brandão, Humberto de Mello. II. Ferrante, Marcos. III. Bemquerer, Marcelo Porto. IV. Título.

**DANIELLE DOS SANTOS CINELLI PINTO**

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE RUMINAL DE DIFERENTES PRODUTOS DE  
BETAGLUCANA EXTRAÍDOS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA  
SUBSIDIAR SEU USO COMO IMUNOFÁRMACO**

**EVALUATION OF THE RUMINAL STABILITY OF DIFFERENT BETAGLUCAN  
PRODUCTS EXTRACTED FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* TO SUBSIDY  
ITS USE AS AN IMMUNODRUG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias, área de concentração em  
Fisiologia e Metabolismo Animal, para obtenção do título  
de Mestre.

APROVADA em 27 de Janeiro de 2023

Dr. Humberto de Mello Brandão – Embrapa Gado de Leite

Dr. Nelson Luis Goncalves Dias de Souza – UFT – Departamento de Química

Dr. Dielson da Silva Vieira – Yale University School of Medicine

Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão

Orientador

Prof. Dr. Marcos Ferrante

Prof. Dr. Marcelo Porto Bemquerer

Coorientadores

**LAVRAS - MG**

**2023**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer nos momentos difíceis, por toda a sabedoria e por ser o caminho para eu pudesse realizar esse sonho.

Aos meus pais Marcia e Marcello e irmão Guilherme, pelo companheirismo e carinho, por sempre incentivarem meus estudos e nunca medirem esforços para me apoiar nas minhas escolhas, sempre me dando as melhores condições, com muito amor e dedicação, para que eu chegasse até aqui. Amo vocês.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que de alguma forma viveram o mestrado comigo, Dielson, Aloysio, Abbias, Rafaela, Isis, João Vitor, Melissa, Edvaldo, Juliana, Michelle, Luísa, Mariana, pela companhia no laboratório e na fazenda, pelos auxílios nas análises, discussões a respeito do tema e na escrita desta dissertação. Obrigada pelos conselhos e por ouvirem meus desabafos e, principalmente, pela amizade.

Às doutoras pesquisadoras Camila Almeida, Luiz Fernando Cappa e Robson Barducci e aos membros da banca de qualificação e defesa para avaliação deste projeto, Humberto Brandão, Marcos Ferrante, Marcelo Bemquerer, Nelson Luis Gonçalves, Dielson Vieira e Bruno Carvalho, por todo o suporte, pela paciência e pelas inúmeras contribuições à execução deste trabalho.

Ao meu orientador, Humberto Brandão, por todos os ensinamentos durante todos esses anos de jornada acadêmica, desde à iniciação científica, por sempre me estimular a ter senso crítico, ter segurança no que faço e confiar no meu potencial, por todos os conselhos dados e paciência comigo.

Aos meus coorientadores, Marcos Ferrante e Marcelo Bemquerer, que me ensinaram mais sobre pesquisa, trabalho em equipe e interdisciplinaridade.

Aos funcionários da Embrapa, que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Em especial, agradeço ao Amarildo, que nunca mediu esforços para me ajudar nos experimento de campo e por todo o carinho que sempre teve comigo.

À Embrapa Gado de Leite, sede e campo experimental, por me proporcionar todo o crescimento profissional desde 2015 até hoje.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFLA.

À BIORIGIN, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 313757/2019-4), a

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - CVZ PPM 00691/17 e RED-00282/16) e a REDE AGRONANO.

## RESUMO

O uso inapropriado de antibióticos, tanto em humanos quanto em animais é o principal responsável pela seleção de bactérias patogênicas multirresistentes. Na bovinocultura, uma das alternativas recentes mais promissoras ao tratamento clássico com antibióticos é o uso de imunomoduladores, no intuito de melhorar as defesas imunológicas do hospedeiro contra patógenos, a fim de promover a redução do uso de antibióticos. Betagluanas são biopolímeros com atividade imunomoduladora em animais superiores, sendo então classificadas como imunofármacos. Pode-se considerar que as betagluanas extraídas de *Saccharomyces cerevisiae* possuem elevada atividade sobre o sistema imune por apresentarem, o que favorece sua ligação aos receptores de células do sistema imune. Na literatura científica, o efeito imunofarmacológico da betagluana para monogástricos é bastante consolidado, o que não ocorre para ruminantes. Em parte, isso ocorre em virtude de resultados científicos antagônicos, nos quais alguns identificam efeitos positivos do biopolímero sobre o sistema imune, enquanto outros não identificam atividade biológica significativa. Considerando tanto estas diferenças de resposta biológica, quanto às peculiaridades anatomofisiológica do sistema digestivo destes dois grupos de animais, foi hipotetizado que a betagluana pode sofrer alguma biotransformação no rúmen de bovinos, após sua administração oral. Isto poderia impactar na biodisponibilidade do fármaco para os segmentos posteriores do sistema digestivo. Diante do exposto, o presente projeto tem por objetivo avaliar a estabilidade ruminal de quatro produtos de betagluana extraídos de uma mesma estirpe de *S.cerevisiae*, com variações no meio de cultura e no processo de extração. As amostras foram incubadas no rúmen de bovinos fistulados (*in situ*) durante 72 horas. Os tempos de análises foram 6, 12, 24, 48 e 72 h. Para essas amostras foram avaliadas a perda de massa e as modificações químicas da cadeia polimérica por técnicas de espectroscopia Raman, espectroscopia no infravermelho e RMN. A velocidade de perda de massa variou em todos os extratos de betagluana, provavelmente após clivagem da cadeia polimérica nas ligações  $\beta(1,3)$  e  $\beta(1,6)$ . Com perda de peso molecular e intensidade de ramificação da cadeia polimérica. A passagem da betagluana pelo rúmen promoveu modificações químicas em diferentes extratos de betagluana. Tal condição apresenta potencial tanto para impactar na biodisponibilidade quanto na atividade biológica da betagluana administrada oralmente para bovinos.

**Palavras chave:** Biopolímero. Estrutura química. Imunomodulação. Patógenos. Resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

The inappropriate use of antibiotics, both in humans and animals, is primarily responsible for the selection of multidrug-resistant pathogenic bacteria. In cattle, one of the most promising recent alternatives to the classic treatment with antibiotics is the use of immunomodulators, in order to improve the host's immune defenses against pathogens, in order to promote the reduction of the use of antibiotics. Betaglucans are biopolymers with immunomodulatory activity in higher animals and are therefore classified as immunopharmaceuticals. It can be considered that betaglucans extracted from *Saccharomyces cerevisiae* have high activity on the immune system because they present, which favors their binding to immune system cell receptors. In the scientific literature, the immunopharmacological effect of betaglucan for monogastric animals is well established, which does not occur for ruminants. In part, this is due to antagonistic scientific results, in which some identify positive effects of the biopolymer on the immune system, while others do not identify significant biological activity. Considering both these differences in biological response and the anatomophysiological peculiarities of the digestive system of these two groups of animals, it was hypothesized that betaglucan may undergo some biotransformation in the bovine rumen after oral administration. This could impact the drug's bioavailability to the posterior segments of the digestive system. Given the above, the present project aims to evaluate the ruminal stability of four betaglucan products extracted from the same strain of *S. cerevisiae*, with variations in the culture medium and in the extraction process. Samples were incubated in the rumen of fistulated cattle (*in situ*) for 72 hours. The analysis times were 6, 12, 24, 48 and 72 h. For these samples, mass loss and chemical modifications of the polymeric chain were evaluated by Raman spectroscopy, infrared spectroscopy and NMR techniques. The rate of mass loss varied in all betaglucan extracts, probably after cleavage of the polymeric chain at the  $\beta(1,3)$  and  $\beta(1,6)$  bonds. With loss of molecular weight and intensity of polymer chain branching. The passage of betaglucan through the rumen promoted chemical modifications in different betaglucan extracts. Such a condition has the potential to impact both the bioavailability and the biological activity of orally administered beta-glucan for cattle.

**Keywords:** Antimicrobial resistance. Biopolymer. Chemical structure. Immunomodulation. Pathogens.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura molecular de betaglucanas derivadas de bactérias, fungos, leveduras e cereais -----	15
<b>Figura 2</b> - Organograma das diferentes fontes de betaglucana -----	15
<b>Figura 3</b> - (A) Estrutura geral da parede celular de fungos. (B) As características estruturais do <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> são distintas -----	17
<b>Figura 4</b> - Captação, tráfego e ativação imune de betaglucanas -----	27
<b>Figura 5</b> - Esquema do sistema digestivo de ruminantes, com foco nos compartimentos do estômago (rúmen, retículo, omaso e abomaso) -----	28
<b>Figura 6</b> - Espectros Raman e Infravermelho da betaglucana pré incubação ruminal e em diferentes tempos pós incubação ruminal-----	36
<b>Figura 7</b> - Imagens da betaglucana antes (macroscopia) (A) e (MEV) (B) e após 24 horas de incubação ruminal (macroscopia) (C) e (MEV) (D) -----	38
<b>Figura 8</b> - Espectro de absorção no infravermelho da quitina (a), celulose (b), BG4 (c), BG2 (d), BG3 (e) e BG1 (f) -----	40
<b>Figura 9</b> - Deconvolução dos espectros de absorção no infravermelho do BG3 (a), BG2 (b), BG1 (c), BG4 (d) -----	43
<b>Figura 10</b> - Comparação da massa residual entre as quatro fontes de betaglucana incubadas no rúmen bovino por um período de 168 h -----	44
<b>Figura 11</b> - Espectro de absorção no infravermelho do BG4 após submetido ao sistema ruminal por diferentes períodos -----	45
<b>Figura 12</b> - Espectro de absorção no infravermelho do BG3 após submetido ao sistema ruminal por diferentes períodos -----	46
<b>Figura 13</b> - Espectro de absorção no infravermelho do BG2 após submetido ao sistema ruminal por diferentes períodos -----	47
<b>Figura 14</b> - Espectro Uv-vis do vermelho do congo (a), quitina (b), celulose (c), BG4 (d), BG3 (e), BG2 (f) e BG1 (g) -----	49

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Fontes e propriedades químicas das betaglucanas mais comumente relatadas ----	16
<b>Quadro 1</b> - Sumário de receptores de betaglucana -----	20
<b>Quadro 2</b> - Efeito da betaglucana nas células imunes -----	23
<b>Tabela 2</b> - Composição centesimal da dieta utilizada no experimento -----	32
<b>Tabela 3</b> - Tentativa de atribuição vibracional baseada em polissacarídeos similares e cálculos de estrutura eletrônica da literatura -----	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AGVs** Ácidos graxos voláteis  
**AP-1** Proteína ativadora 1  
**ASE:** Amostra seca em estufa  
**ATR:** Reflectância total atenuada  
**BG:** Betaglucana  
**Cm:** Centímetro  
**C<sub>max</sub>:** Concentração máxima plasmática  
**COX:** Ciclo-oxigenase 2  
**CR3:** Receptor do complemento 3  
**CXCR3:** Receptor 3 de quimiocina  
**CZ:** Cinzas  
**CZ-FDN:** Cinza de fibra em detergente neutro  
**Da:** Daltons  
**DC:** Célula dendrítica  
**DIV MS:** Digestibilidade *in vitro* da matéria seca  
**DIV-FDN:** Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro  
**EB:** Energia bruta  
**EE:** Extrato etéreo  
**ERRO:** Espécie reativa de oxigênio  
**FDA:** Fibra em detergente ácido  
**FDN:** Fibra em detergente neutro  
**GALT:** Tecido linfóide associado ao intestino  
**GM-CSF:** Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos  
**HDL:** *High-density lipoprotein*  
**iC3b:** C3b inativado  
**IECs:** Células epiteliais intestinais  
**IFN- $\gamma$ :** Interferon gama  
**Ig:** Imunoglobulina  
**IL:** Interleucina  
**ITAM:** *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*  
**Kcal:** Kilocalorias  
**Kg:** Kilogramas  
**LacCer:** Lactosilceramida  
**LDL:** *Low-density lipoprotein*  
**Lig:** Lignina  
**MHCII:** complexo principal de histocompatibilidade II  
**MIF:** Fator inibidor da migração de macrófagos  
**MIP-2:** Proteína inflamatória de macrófagos tipo 2  
**mL:** Mililitros  
**MØ:** Macrófago  
**mRNA:** RNA mensageiro  
**N.D.:** Não determinado  
**NFAT:** Fator nuclear de células T ativadas  
**NF- $\kappa\beta$ :** Fator nuclear kappa beta  
**NK:** *Natural killer*  
**PAMP:** Padrões moleculares associados aos patógenos  
**PB:** Proteína bruta

**PB-FDA:** Proteína bruta da fibra em detergente ácido  
**PB-FDN:** Proteína bruta da fibra em detergente neutro  
**PB-TBF:** Proteína bruta em tampão borato fosfato  
**PB-TCA:** Proteína bruta em ácido tricloroacético  
**PGG:** Poli-glicopiranosil-glicopiranosose  
**pH:** Potencial hidrogeniônico  
**PIB:** Produto interno bruto  
**PKC:** Proteína cinase C  
**PMNs:** Neutrófilos polimorfonucleares  
**PRR:** Receptor de reconhecimento padrão  
**PSK:** Polissacarídeo K  
**RMN:** Ressonância magnética nuclear  
**SSG:** Esclerotinano  
**Th:** Linfócito *T helper*  
**TLR:** *Toll-like receptor*  
**TNF $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa  
**UFC:** Unidade formadora de colônia  
**WGP:** *Whole glucan particles*

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. BETAGLUCANAS</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Definição, fontes e estrutura química</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Atividade imunofarmacológica da betaglucana</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Dinâmica da betaglucana no trato gastrointestinal</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4 Peculiaridades do sistema digestivo de ruminantes que podem impactar na estabilidade da betaglucana</b> .....	<b>27</b>
<b>3. HIPOTESE</b> .....	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVO</b> .....	<b>30</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>5.1 Fontes de betaglucana, quitina e celulose</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2 Animais e delineamento experimental</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2.1 Experimento 1</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2.2 Experimento 2</b> .....	<b>32</b>
<b>5.3 Análise por espectroscopia no infravermelho</b> .....	<b>33</b>
<b>5.4 Análise por espectroscopia Raman</b> .....	<b>33</b>
<b>5.5 Medidas de microscopia eletrônica de varredura</b> .....	<b>33</b>
<b>5.6 Método de ensaio colorimétrico de betaglucanas utilizando vermelho do congo</b> .....	<b>33</b>
<b>6. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>6.1 Experimento 1</b> .....	<b>34</b>
<b>6.2 Experimento 2</b> .....	<b>38</b>
<b>6.2.1 Espectroscopia no infravermelho para quatro betaglucanas obtidas por diferentes processos de extração</b> .....	<b>39</b>
<b>6.2.2 Espectroscopia UV-vis</b> .....	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÕES PARCIAIS</b> .....	<b>49</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	<b>61</b>
<b>ARTIGO - Evaluation of ruminal stability of different betaglucan extracts to support its use as an immunopharmaceutical</b> .....	<b>62</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que em 2050 a resistência antimicrobiana será responsável por provocar 10 milhões de mortes anuais da população humana e uma supressão econômica de cerca de 1 trilhão de dólares, além disso, estudos mostraram que o Produto Interno Bruto (PIB) anual pode diminuir em 1% globalmente, mas aproximadamente 5-7% para os países em desenvolvimento (PULINGAM *et al.*, 2021). O uso inapropriado e excessivo de antibióticos, tanto em humanos quanto em animais é o principal fator responsável pela seleção de bactérias patogênicas multirresistentes (LARSSON e FLACH, 2022). Tais estimativas despertam simultaneamente preocupações tanto no âmbito governamental quanto nos consumidores finais de proteínas de origem animal (GADDE *et al.*, 2017). De uma forma geral, melhorar as defesas imunológicas do hospedeiro contra patógenos auxilia na prevenção da resistência antimicrobiana (HANDEL *et al.*, 2009; PULINGAM *et al.*, 2021). Isso, por que, de acordo com o Comitê de Produtos Medicinais para uso Veterinário da Comunidade Europeia, o aumento do estado imune de rebanhos promove redução do uso de antibióticos, pois dificulta a dispersão dos patógenos, aumenta a resiliência animal contra infecções e reduz a necessidade de terapêutica antimicrobiana (MURPHY *et al.*, 2017).

Assim, o uso de imunomoduladores para aumentar as respostas de defesa do hospedeiro tornou-se uma estratégia promissora e crescente para mitigar o consumo de antibióticos dentro do conceito de busca por uma pecuária que se alinha às atuais preocupações mundiais sobre o enfrentamento do desafio da multiresistência antimicrobiana (SCHEPETKIN e QUINN, 2006). Imunomoduladores são compostos químicos capazes de aumentar ou suprimir a resposta imune para ajustá-la a um desafio, o qual pode ser infeccioso ou não (KATSNELSON, A., 2020). Essa abordagem favorece que os mecanismos endógenos do hospedeiro sejam utilizados para potencializar a defesa do animal contra os agentes infecciosos (TZIANABOS A., 2000).

Dentro do conceito de imunomodulação, a betaglucana vem sendo utilizada como um imunofármaco oral em animais de produção para elevar o seu *status* imune (MURPHY *et al.*, 2017). Esta prática tem sido feita com sucesso em aves (SCHWARTZ *et al.*, 2021), em suínos (PORNANEK e PHOEMCHALARD, 2021) e com peixes (CHING *et al.*, 2021). Todavia, em ruminantes o uso da betaglucana ainda é controverso. Enquanto Pedro e colaboradores (2021) sugerem que monócitos bovinos expostos *in vitro* à betaglucana aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias e respondem positivamente a um padrão de imunidade treinada,

Gimenes e colaboradores (2020) e Uchiyama e colaboradores (2012) não encontraram efeitos significativos da betaglucana no sistema imune de bovinos *in vivo*.

A explicação para as diferenças nas respostas biológicas entre ruminantes e monogástricos ainda não é clara, mas quando se avalia a literatura que evidencia o estímulo imune da betaglucana administrada para monogástricos pela via oral, identifica-se que a dose efetiva do biopolímero ao atingir o intestino delgado, impacta no reconhecimento da betaglucana pelo GALT e conseqüentemente na resposta sistêmica que o animal irá obter (ALUGONGO *et al.*; 2017; HINO *et al.*, 2020). Frente às diferenças anatomofisiológicas destes dois grupos de animais, mesmo não encontrando literatura referente à estabilidade da betaglucana no rúmen, assim, é de se supor que o biopolímero possa passar por alguma modificação de sua estrutura química durante sua passagem por este compartimento digestivo. Tal hipótese pode ser sustentada por estudos de biopolímeros semelhantes em ambiente ruminal, em que tanto a celulose (XING *et al.*, 2020), quanto a quitosana (SOUZA *et al.*, 2011), as quais também possuem ligações glicosídicas, apresentam baixa estabilidade ruminal devido à intensa clivagem da cadeia polimérica por ação enzimática da microbiota residente. Diante do exposto, o presente trabalho visa gerar conhecimento que auxilie na compreensão das transformações químicas da betaglucana no rúmen de modo a contribuir para seu uso eficiente para bovinos.

## **2. BETAGLUCANAS**

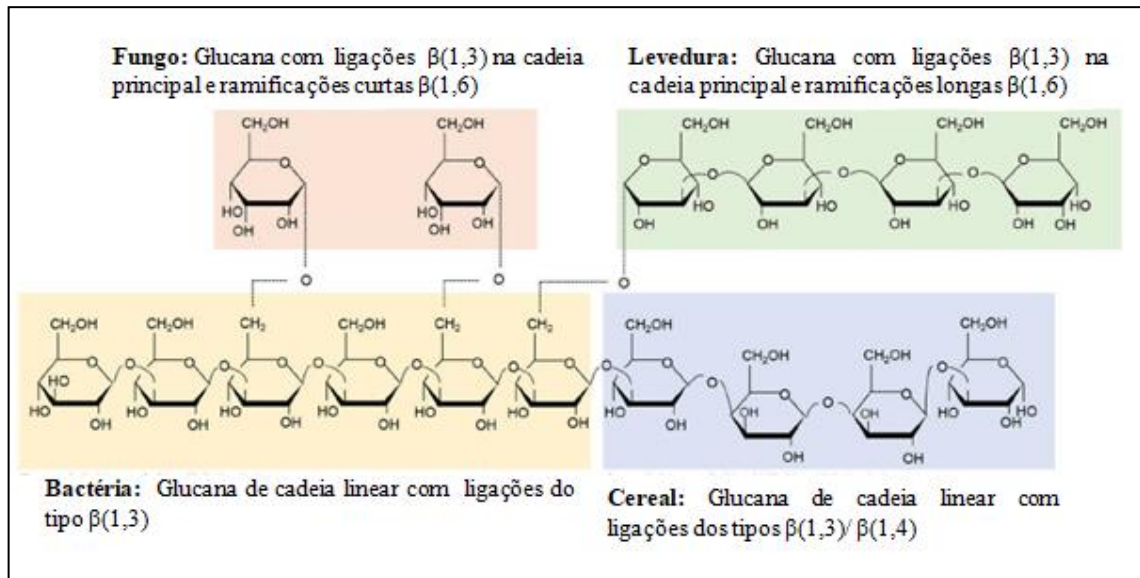
### **2.1. Definição, fontes e estrutura química**

Polissacarídeos são biopolímeros formados por unidades monoméricas de carboidratos unidas entre si por ligações glicosídicas, os quais se diferenciam pela composição dos monômeros, grau de ramificação, comprimento das cadeias, tipos de ligação, podendo, portanto, formar uma diversidade de compostos químicos e conseqüentemente com diferentes propriedades físico-químicas (FREIMUND *et al.*, 2003; ZONG *et al.*, 2012; SECHI *et al.*, 2017). De uma forma geral, as unidades monoméricas da cadeia principal de polissacarídeos são monossacarídeos de seis carbonos, a fórmula geral desses polímeros pode ser representada como  $(C_6H_{10}O_5)_n$  onde  $40 \leq n \leq 3000$ . Quanto à origem dos polissacarídeos caracterizados como biopolímeros, estes podem ser classificados em dois grupos: naturais, provenientes de algas, plantas, microrganismos e animais, ou semissintéticos, produzidos por modificação química ou enzimática das macromoléculas de origem. (ZONG *et al.*, 2012).

Conforme ilustrado na Figura 1, a betaglucana é composta por unidades monoméricas de D-glicose, unidas por ligações  $\beta$ -glicosídicas dos tipos (1,3), (1,4) e/ou (1,6), podendo ou não apresentar ramificações em sua molécula (AHMAD *et al.*, 2018). Embora historicamente

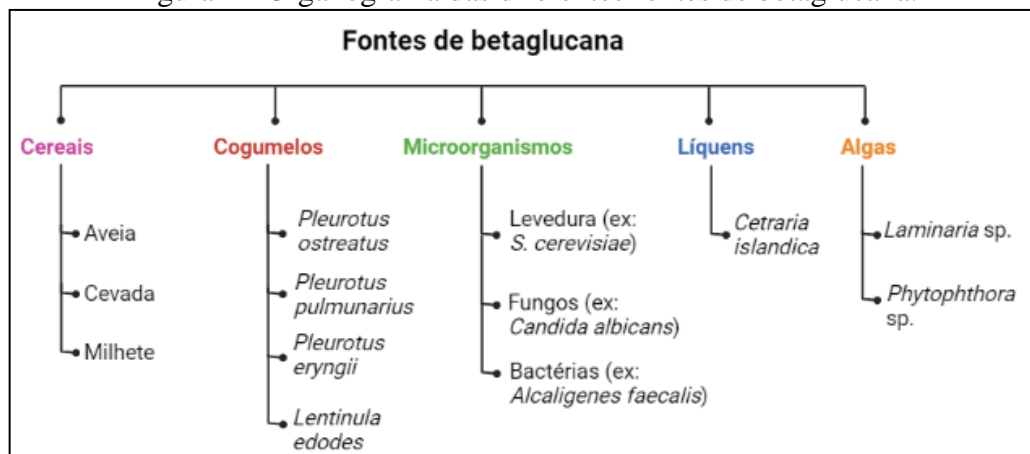
os cereais sejam a fonte mais conhecida de betaglucana em função da sua abundância, como o observado na Figura 2, a betaglucana também está presente na parede celular de outras espécies, como, por exemplo, fungos, bactérias e algas. Por sua vez, essas betagluconas isoladas de diferentes fontes variam bastante quanto às características de suas ligações glicosídicas, grau de ramificação, peso molecular e solubilidade (KAUR *et al.*, 2019).

Figura 1 - Estrutura molecular de betagluconas derivadas de bactérias, fungos, leveduras e cereais.



Fonte: adaptado de de Graaff *et al* (2018).

Figura 2 - Organograma das diferentes fontes de betaglucana.



Fonte: adaptado de Kaur *et al* (2019).

As betagluconas derivadas de cereais possuem, predominantemente, ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1,3)$  e  $\beta(1,4)$ , sem quaisquer ligações  $\beta(1,6)$  (Pizarro, 2014). Por sua vez, cadeias lineares com ligações do tipo  $\beta(1,3)$  e ramificações do tipo  $\beta(1,6)$ , são



encontradas em fungos e algumas algas, enquanto que betaglucanas bacterianas possuem apenas cadeias lineares retas com ligações do tipo  $\beta(1,3)$  (MANNERS *et al.*, 1973; VACLAV e MIROSLAV, 2013). Com relação á solubilidade, este parâmetro físico-químico costuma ser influenciado tanto pelo peso molecular e tipo de ligação, quanto pelo grau de ramificação das betaglucanas (VACLAV e MIROSLAV, 2013) (Tabela 1). Assim, em função da variação desses parâmetros, o que se observa na prática é uma grande variabilidade da solubilidade da betaglucana tanto em função da fonte da matéria-prima quanto do processo de extração (HINO *et al.*,2020).

Tabela 1 - Fontes e propriedades químicas das betaglucanas mais comumente relatadas.

N.D.: Não determinado, PM: peso molecular.

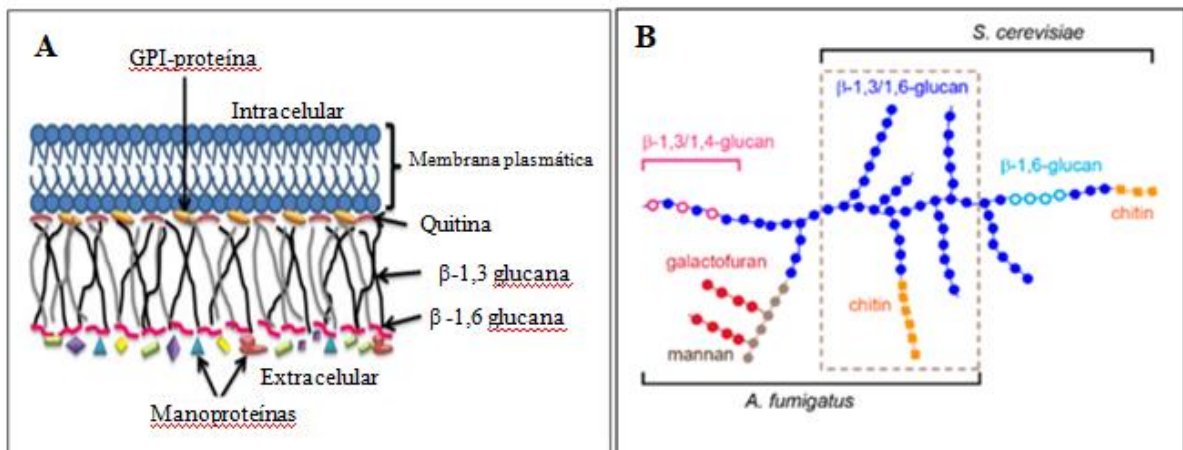
Fonte	Betaglucana	Organismo/espécie	Ligações glicosídicas	PM (KDa)	Solubilidade em água
Alga	Laminarin	<i>Laminaria digitata</i>	$\beta(1,3-1,6)$	3.5-7.7	SIM
Bactéria	Curdlan	<i>Alcaligenes faecali</i>	$\beta(1,3)$	53-2000	NÃO
Fungo	Maitake	<i>Grifola frondosa</i>	$\beta(1,3-1,6)$	1000	SIM
	Lentinan	<i>Lentinula edodes</i>	$\beta(1,3-1,6)$	400-1000	SIM
	Pachyman	<i>Poria cocos</i>	$\beta(1,3-1,6)$	N.D.	NÃO
	PGG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\beta(1,3-1,6)$	120-205	SIM
	Pleuran	<i>Pleurotus ostreatus</i>	$\beta(1,3-1,6)$	N.D.	NÃO
	PSK	<i>Trametes versicolor</i>	$\beta(1,3-1,4)$	94-100	SIM
	Schizophyllan	<i>Schizophyllum commune</i>	$\beta(1,3-1,6)$	450	SIM
	Scleroglucan	<i>Sclerotium rolfsii</i>	$\beta(1,3-1,6)$	1000	SIM
	SSG	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	$\beta(1,3)$	N.D.	SIM
	WGP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\beta(1,3-1,6)$	N.D.	NÃO
	Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\beta(1,3-1,6)$	35-5000	NÃO
	Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\beta(1,3-1,6)$	N.D.	NÃO
	Plantas superiores	Cevada	<i>Hordeum vulgare</i>	$\beta(1,3-1,4)$	23-137
Aveia		<i>Avena sativa</i>	$\beta(1,3-1,6)$	40-359	SIM

Fonte: adaptado de de Graaff *at al* (2018).

Uma importante fonte de betaglucana é a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, um eucarionte unicelular, usado na indústria de panificação e na produção de álcool por rota fermentativa, fato de extrema relevância para o agronegócio brasileiro (PARAPOULI *et al.*, 2020). A parede celular dos fungos é constituída basicamente de polissacarídeos e proteínas, no caso do *Saccharomyces cerevisiae*, sua parede celular é composta por 48-60% de glucana, das quais 50 a 55% são representadas por betaglucanas com ligações do tipo  $\beta-1,3$  e até 15%

são compostas por betaglucanas com ligações do tipo  $\beta$  (1,6), 20-23% de manoproteínas, 0,6-2,7% de quitina, que é composta por  $\beta$  (1,4) N-acetilglicosamina e uma pequena porção de lipídios (AVRAMIA e AMARIEI, 2021). A distribuição destes componentes está organizada em duas camadas principais, sendo a externa composta de manoproteínas e a interna de glucana e quitina, em uma estrutura interconectada por ligações covalentes (Figura 3 A e B) (CABIB *et al.*, 2001, AVRAMIA e AMARIEI, 2021).

Figura 3 - (A) Estrutura geral da parede celular de fungos. (B) As características estruturais do *Aspergillus fumigatus* e *Saccharomyces cerevisiae* são distintas. O módulo comum encontrado em muitas espécies de fungos é delimitado por linhas tracejadas.



Fonte: adaptado de Ghassemi *et al* (2021).

Segundo Kaur *et al* (2019) a potência imunológica das betaglucanas em vertebrados está diretamente relacionadas à sua origem, peso molecular e características estruturais (grau de ramificação e conformação espacial). O peso molecular é influenciado pelo comprimento da cadeia e pelo grau e tamanho das ramificações da molécula, que, por sua vez, são influenciados pelo método de extração e modificação da betaglucana. Técnicas de modificações físicas influenciam nas estruturas espaciais, já a modificação por agentes químicos, hidrólise enzimática, tratamento químico e a irradiação podem afetar tanto a conformação espacial quanto as estruturas primárias da betaglucana.

Dependendo da fonte de betaglucana, seu peso molecular varia de  $10^2$  a  $10^6$  Da (BROWN e GORDON, 2003). Segundo os autores, betaglucanas biologicamente ativas geralmente têm grande peso molecular, enquanto que as de baixo peso molecular (5.000-10.000 Da) apresentam pouca ou nenhuma atividade biológica. Por sua vez, as de peso molecular intermediário possuem ações biológicas *in vivo*, mas seus efeitos celulares são menos evidentes, enquanto que as de alto peso molecular, em ensaios *in vitro*, podem ativar

diretamente os leucócitos, estimulando suas funções fagocíticas, citotóxicas e atividade antimicrobiana (LEE *et al.*, 2002, BROWN e GORDON, 2003, AKRAMIENÉ *et al.*, 2007).

## **2.2. Atividade imunofarmacológica da betaglucana**

Historicamente, a capacidade imunomoduladora das betaglucanas foi detectada na década de 40 do século passado, quando o Zymosan, obtido a partir do extrato da parede celular de *S. cerevisiae*, demonstrou capacidade de ativar o sistema complemento e, somente nas décadas de 60 e 70 demonstrou-se que esta resposta era consequência das ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,3) e  $\beta$ -(1,6) da betaglucana (HINO *et al.*, 2020). Embora esses biopolímeros exibam uma ampla gama de funções biológicas, como pré-bióticos, efeito hipoglicemiante, efeito hipocolesterolêmico e atividade antitumoral (decorrente da ação imunomoduladora) (AKRAMIENÉ *et al.*, 2007), suas propriedades imunofarmacológicas também são exploradas para prevenir e mitigar os sinais clínicos de uma ampla gama de doenças infecciosas em diversas espécies (TZIANABOS, 2000; LOWRY *et al.*, 2005, STUYVEN *et al.*, 2009).

Imunomoduladores são compostos capazes de interagir com o sistema imunológico e estimular/suprimir aspectos específicos da resposta do hospedeiro, os quais, quando ocorrem mediados por receptores celulares, caracterizam-se como imunofármacos (TZIANABOS, 2000). Para Tzianabos, a capacidade imunomoduladora é dependente de fatores, como: dose, via e tempo de administração do composto em questão. Estrategicamente, a imunomodulação terapêutica objetiva modular aspectos da resposta imune do hospedeiro, que possam ser aumentados ou suprimidos de forma a obter o desfecho de resposta biológica desejado pelo clínico ou interventor. Como fruto dessa intervenção, essa abordagem, deve permitir que o hospedeiro melhore sua defesa contra microorganismos invasores durante o curso da infecção.

Embora a compreensão do mecanismo de ação das betaglucanas ainda esteja em desenvolvimento, um dos mecanismos primários de sua ação sobre o sistema imune, envolve o estímulo do sistema imune inato. Isto ocorre por sua interação com receptores específicos de fagócitos, o que modula a produção de diversas citocinas e reflete no sistema imune adaptativo, promovendo a proliferação e diferenciação de células T, B e células natural killer (NK) (KIM *et al.*, 2011). Os principais componentes do sistema imune inato são as células fagocitárias, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, os quais são responsáveis por reconhecer “agentes estranhos” aos organismos, por consequência são os primeiros a reconhecerem a betaglucana. Segundo Novak e Vetvicka (2008), este reconhecimento da betaglucana pelas células fagocitárias é baseado em receptores não clonais - Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs), que identificam moléculas de superfície de microorganismos, denominados Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs).

Destaca-se que os PAMPs são moléculas de alguns seres vivos, não exclusivos de patógenos, que são altamente conservadas do ponto de vista evolutivo, mas que diferem das moléculas do hospedeiro e interagem com os PRRs presentes em células do sistema imune.

Como o efeito final da ação da betaglucana sobre o sistema imune inato se dá pelo aumento da atividade fagocitária e proliferativa, principalmente, de macrófagos e células dendríticas, esses efeitos biológicos são geralmente mais estudados (SCHEPETKIN e QUINN, 2006). No entanto, as vias de sinalização exatas dos respectivos receptores e a intercomunicação entre estes ainda são obscuras, principalmente se tratando de ruminantes (KIM et al., 2011).

Os principais PRRs que interagem com as betaglucanas são os receptores Toll-Like (TLR2), lectina-1 tipo C associada às células dendríticas (Dectina-1), receptor do complemento 3 (CR3) e a lactosilceramida (LacCer) (Quadro 1). (KIM *et al.*, 2011, HINO *et al.*, 2020).

Quadro 1 - Sumário de receptores de betaglucana.

<b>Receptor</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Principais funções</b>	<b>Outros ligantes ao receptor que não são betaglucana</b>
<b>Dectina-1</b>	Células mononucleares, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T.	Fagocitose, produção de ROS e citocinas	Componentes celulares não identificados de fungos e proteínas de membrana de células T
<b>Receptor complemento 3 (CD11b/CD18)</b>	Células NK, neutrófilos, células B e T.	Citotoxicidade em células cancerígenas	Vários componentes microbianos
<b>Lactosilceramidas</b>	Neutrófilos, células epiteliais	Produção de citocinas e EROs	Vários componentes microbianos
<b>Receptor Toll-like 2</b>	Macrófagos, células dendríticas, células B e T, células epiteliais	Produção de citocinas	Vários componentes microbianos
<b>Receptor scavenger</b>	Células endoteliais, células mieloides	Fagocitose	LDL, HDL

Fonte: adaptado de (Hino *et al.*, 2020).

Segundo Hino e colaboradores (2020), a dectina-1 é um dos PRRs mais bem caracterizados no que diz respeito à ligação da betaglucana, sendo encontrada na superfície de monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Este receptor é uma proteína transmembrana única do tipo II que possui um domínio lectina tipo C, semelhante ao receptor de células *Natural Killer*, no que tange ao domínio extracelular. A dectina-1 possui um *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) no seu domínio intracelular que sofre fosforilação da tirosina pela ligação com betaglucanas, ativando, assim, várias vias de sinalização celular. A dectina-1 possui 244 resíduos de aminoácidos e seis resíduos de cisteína, nas proximidades do quarto resíduo de cisteína localizam-se dois aminoácidos (Trp221 e His223) que parecem ser críticos para a ligação da betaglucana ao receptor (PALMA *et al.*, 2006). Segundo os autores, este receptor reconhece especificamente betaglucanas do tipo  $\beta$ -(1,3) (1,6) de fungos, plantas e bactérias, não sendo ativado para betaglucanas com ligações  $\beta$ -(1,4) ou  $\alpha$ -mananas. Como consequência da interação entre betaglucana e o receptor dectina-1 ocorre aumento da atividade fagocitária e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de citocinas inflamatórias (PALMA *et al.*, 2006).

Vários estudos relataram sinalização colaborativa de dectina-1 em combinação com TLRs (DE GRAAFF *et al.*, 2018). Os receptores do tipo *Toll-like 2* (TLR2) são proteínas da família TLR que possuem um domínio extracelular contendo sequências repetitivas ricas em leucina, os quais funcionam como receptores de reconhecimento de ácidos lipoteicóicos e peptidoglicanos, componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas (HINO *et al.*, 2020). Apesar destes receptores apresentarem alta afinidade pelos componentes bacterianos supracitados, eles também se ligam às betaglucanas, como por exemplo, o Zymosan que se liga aos TLR 2 e 4 de macrófagos e aumentam a produção celular de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-12, via de sinalização NF- $\kappa$ B (LEBRON *et al.*, 2003). As ativações dos TLRs e da dectina-1 promovem respectivamente o disparo das cascatas dectina-1/Syk e TLR/Myd88, responsáveis por induzir a translocação das subunidades de fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) para o núcleo das células fagocitárias e, com isso promover a transcrição de genes pró-inflamatórios e associados à ativação dos macrófagos (DENNEHY *et al.*, 2008).

A betaglucana também possui afinidade com o receptor do complemento 3 (CR3), que é uma integrina transmembranar heterodimérica composta pelas cadeias CD11b e CD18, onde a subunidade CD11b apresenta sítios de ligação semelhante à lectina no domínio extracelular, o qual se liga à betaglucana (XIA *et al.*, 1999). A interação do CR3 com a betaglucana é conhecida por aumentar a atividade citotóxica contra microorganismos patogênicos opsonizados e células tumorais (XIA *et al.*, 1999, HINO *et al.*, 2020). Isso é conseguido em função de incremento nas respostas celulares associados aos processos de adesão, citotoxicidade, fagocitose, degranulação e migração.

Lactosilceramida (LacCer) é um receptor do tipo glicosíngolípídeo localizado na membrana plasmática que possui uma porção composta por uma ceramida hidrofóbica e outra de açúcar hidrofílico. Este tipo de receptor é frequentemente encontrado em neutrófilos e células epiteliais e estão associados ao reconhecimento de betaglucanas em diversos microorganismos como, por exemplo, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae* (JIMENEZ-LUCHO *et al.*, 1990). Em macrófagos, a betaglucana induziu a produção de proteína inflamatória de macrófagos tipo 2 (MIP-2) e TNF- $\alpha$  via sinalização por NF- $\kappa$ B e proteína cinase C (PKC) (WANG *et al.*, 2005, LEHTOVAARA *et al.*, 2011). A interação da betaglucana com a lactosilceramida causa diferentes respostas celulares, incluindo produção de citocinas, de EROs e diferenciação de macrófagos tipo 2 (NOVAK e VETVICKA, 2008).

Embora as betaglucanas ativem várias vias de sinalizações celulares associadas à resposta imune inata, elas também podem atuar na imunidade adquirida. A imunidade adquirida é mediada primeiramente por linfócitos B e T. Os linfócitos B estão envolvidos principalmente na resposta de anticorpos (resposta imune humoral), enquanto que os linfócitos T são responsáveis pela resposta imune celular. A imunidade adquirida necessita da apresentação do antígeno por fagócitos (células dendríticas e macrófagos) (DE GRAAFF *et al.*, 2018). Em adição, após a ativação de células dendríticas, macrófagos e algumas outras células do sistema imune inato pelas betaglucas, diversas citocinas são secretadas, e as mesmas são essenciais tanto para promover a diferenciação e maturação dos linfócitos T auxiliares (Th), durante a apresentação do antígeno, quanto para modular a intensidade do tipo de classe de imunoglobulinas (Ig) produzidas pelos linfócitos B (HINO *et al.*, 2020). O Quadro 2 apresenta os efeitos da betaglucana nas células do sistema imune.

Quadro 2 - Efeito da betaglucana nas células imunes.

Tipo de célula imune <sup>b</sup>	Betaglucana	Potencialização de:	Atenuação de:
Neutrófilos	$\beta$ -(1→6)-glucana de ( <i>Candida albicans</i> ) PGG <sup>c</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expressão gênica de proteínas de choque térmico;</li> <li>• Produção de ERO;</li> <li>• Fagocitose;</li> <li>• Cascata de complemento e opsonização por C3b e mais degradação em iC3b e C3dg</li> </ul>	
Macrófagos	Cevada, Aveia, Lentinan <sup>c</sup> Wellmune Solúvel, Lentinan <sup>c</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expressão gênica de IL-1<math>\beta</math>, IL-8 e IL-10;</li> <li>• Expressão gênica de receptores de lectina tipo C;</li> <li>• Inclinando os macrófagos em direção a um perfil alternativo de expressão gênica semelhante ao M1</li> </ul>	
Células dendríticas	WGP <sup>c</sup> Curdlan <sup>c</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expressão gênica de IL-6, IL-12, IL-2, TNF-<math>\alpha</math> e IFN-<math>\gamma</math>;</li> <li>• Expressão de superfície de CD11c, HLA-DR, CD86 e CD40;</li> <li>• Produção de IFN-<math>\gamma</math>, IL-2 e IL12p40;</li> <li>• Expressão gênica e secreção proteica de IL-1<math>\beta</math>, IL-6 e IL-23</li> </ul>	
Linfócitos B	Curdlan, Zymosan <sup>c</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produção de TNF-<math>\alpha</math>, IL-6 e IL-8</li> </ul>	Produção de IgM e proliferação de células B
Células supressoras derivadas de mielóides	Curdlan <sup>d</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expressão gênica de IL-12p35;</li> <li>• Expressão de superfície de CD11c, CD40, CD86, MHCII e CD80</li> </ul>	Atividade da arginase e nitritos no baço

Legenda: <sup>a</sup> iC3b: C3b inativado; IFN- $\gamma$ : interferon gama; IgM: imunoglobulina M; MHCII: complexo principal de histocompatibilidade II; ERO: espécies reativas de oxigênio; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa. <sup>b</sup> Para tipos de células imunes não listados (como linfócitos T),  $\beta$  glucanas não foram (ainda) relatadas como indutores de efeitos diretos. <sup>c</sup> Células primárias humanas e linhas celulares. <sup>d</sup> Estudo com camundongos.

Fonte: Quadro traduzido de de Graaff (2018).

Segundo Sonck e colaboradores (2010) as glucanas estimulam a produção de uma variedade de mediadores, destacando-se o TNF-R, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), MIP-2 e, as interleucinas IL-1 $\beta$ , L-8, IL-10, IL-12, IL-4, IL6. Como consequência das alterações das concentrações dessas biomoléculas em modelos murinos, destaca-se o estímulo para indução da diferenciação dos linfócitos Th,



principalmente os Th1 e Th17 (LEIBUNDGUT-LANDMANN *et al.*, 2007). Por outro lado, a betaglucana está envolvida na indução da tolerância imunológica da microbiota comensal, mediada pela ativação do eixo de sinalização dectina1-COX2 (ciclo-oxigenase 2) das células dendríticas que atuam na diferenciação de linfócitos T *naives* em linfócitos T regulatórios antígeno-específicos (Treg) (DILLON *et al.*, 2006, LEE *et al.*, 2021).

Levando em consideração as potencialidades do uso estratégico da betaglucana como imunofármaco para prevenção/controle de doenças infecciosas, Omara *et al* (2021), mostraram um efeito protetor da suplementação dietética com betaglucana em frangos de corte, infectados experimentalmente com *Eimeria*. Nesse experimento, os efeitos protetores da betaglucana a 0,1% de peso vivo foram correlacionados com a resposta tardia no escore de lesão e foram explicados pelo aumento da expressão de IL-10, IL-17F, IFN- $\gamma$ , iNOS e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) no timo a partir do décimo quarto dia de experimento. Por sua vez, Sun *et al* (2020), avaliaram a capacidade terapêutica da betaglucana contra a infecção vaginal por *Candida albicans*. Camundongos que receberam betaglucana após a infecção tiveram 85% menos UFC do que camundongos do grupo controle. Em comparação com o grupo controle, a betaglucana reduziu a migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) na vagina, diminuiu os níveis de mRNA das citocinas IL23, IL22, IL17a e IL17f, genes anticândidas S100a8 e S100a9 e diminuiu a expressão do receptor de reconhecimento de padrão de *C. albicans*, dectina-1, sugerindo que a betaglucana pode ser um potencial agente terapêutico para infecção vaginal por *C. albicans*. Também em camundongos infectados experimentalmente com *Leishmania donovani*, Patidar *et al* (2020), avaliaram a imunomodulação da betaglucana de cevada e do zymosan, através da interação com os receptores dectina-1 e TLR2 de macrófagos. Nesse experimento, ambas as fontes de betaglucana interagiram com os dois receptores, ativaram as vias mediadas por MyD88 e Syk apresentaram respostas inflamatórias aumentadas em macrófagos e induziram proteção dependente de linfócitos T no hospedeiro. Quando compararam a afinidade das duas fontes de betaglucana aos receptores avaliados, identificaram que nas condições experimentais o biopolímero tem maior capacidade de interação com a dectina-1. Em experimentos um pouco mais antigos, a atividade “anti-infecciosa” das betaglucanas também foi testada em modelos de doenças bacterianas em desafios *in vivo* contra infecções por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (WILLIAMS, et al, 1983, DILUZIO e WILLIAMS, 1978). Williams e colaboradores (1983) administraram betaglucana de *S. cerevisiae* via intraperitoneal e avaliaram tal atividade em infecções experimentais por *E. coli*, enquanto que Diluzio e Williams (1978) avaliaram esse efeito após administração intravenosa de betaglucana em

infecção experimental *in vivo* por *S. aureus* (DILUZIO e WILLIAMS, 1978). Em ambos os casos, o tratamento com a betaglucana promoveu redução da mortalidade ou a diminuição da contagem bacteriana em animais infectados.

### 2.3. Dinâmica da betaglucana no trato gastrointestinal

Existem poucos estudos que examinaram a dinâmica das betaglucanas no trato digestivo e sua absorção ao longo do intestino. Muitos dos estudos que investigam o efeito da administração oral da betaglucana no corpo, utilizaram parâmetros de resultados biológicos sistêmicos clínicos, os quais apresentam certo grau de subjetividade como indicadores de efeitos fisiológicos, sem, contudo, avaliar a absorção, a estabilidade e os parâmetros farmacocinéticos do biopolímero. De uma forma geral, isto ocorre frente aos desafios analíticos para extrair, identificar e quantificar diretamente as cadeias poliméricas em matrizes biológicas complexas (WRIGHT *et al.*, 2011). Isto ocorre porque além das cadeias poliméricas da betaglucana purificada apresentarem naturalmente grande variação de peso molecular e por estarem ligadas a outros compostos químicos complexos (*e.g.* quitosana, quitina, peptídeos,...). Um segundo dificultador é o fato do biopolímero sofrer modificações químicas durante o trânsito intestinal.

Como exemplo destas limitações temos o trabalho de Rice *et al* (2005), que fizeram uma medida indireta de fluorescência para estimar a concentração máxima plasmática ( $C_{max}$ ) da betaglucana em ratos. Nesse experimento, os autores administraram por gavagem três tipos de betaglucanas marcadas com fluorocromos que apresentavam diferentes graus de polimerização e modificação do grupo funcional em ratos adultos. Nesse experimento, os autores identificaram que o  $C_{max}$  de fluorescência variou em função do peso molecular e do grupo funcional.

Em monogásticos, as betaglucanas administradas por via oral chegam em uma forma “não digerida no intestino” (*i.e.* na forma de oligômeros e polímeros), pois este grupo carece de  $\beta$ -glicosidases. Durante o trânsito da betaglucana no sistema digestório, segundo Rice *et al* (2005), as betaglucanas são provavelmente capturadas no intestino proximal por células epiteliais intestinais (IECs) ou células M da mucosa nas placas de Peyer e, posteriormente, reconhecidas por subconjuntos de células dendríticas CD103+ e macrófagos CXCR3+ dentro do tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Aparentemente, a captação por IECs parece ser independente da dectina-1, enquanto a captação da betaglucana pelo GALT aparenta dependência dos receptores dectina-1 e TLR2 das células M. (De GRAAFF *et al.*, 2018). Segundo Adans e colaboradores (2008), após a internalização das betaglucanas por células fagocitárias ocorrem clivagens das cadeias poliméricas, seguidas de secreções de frações

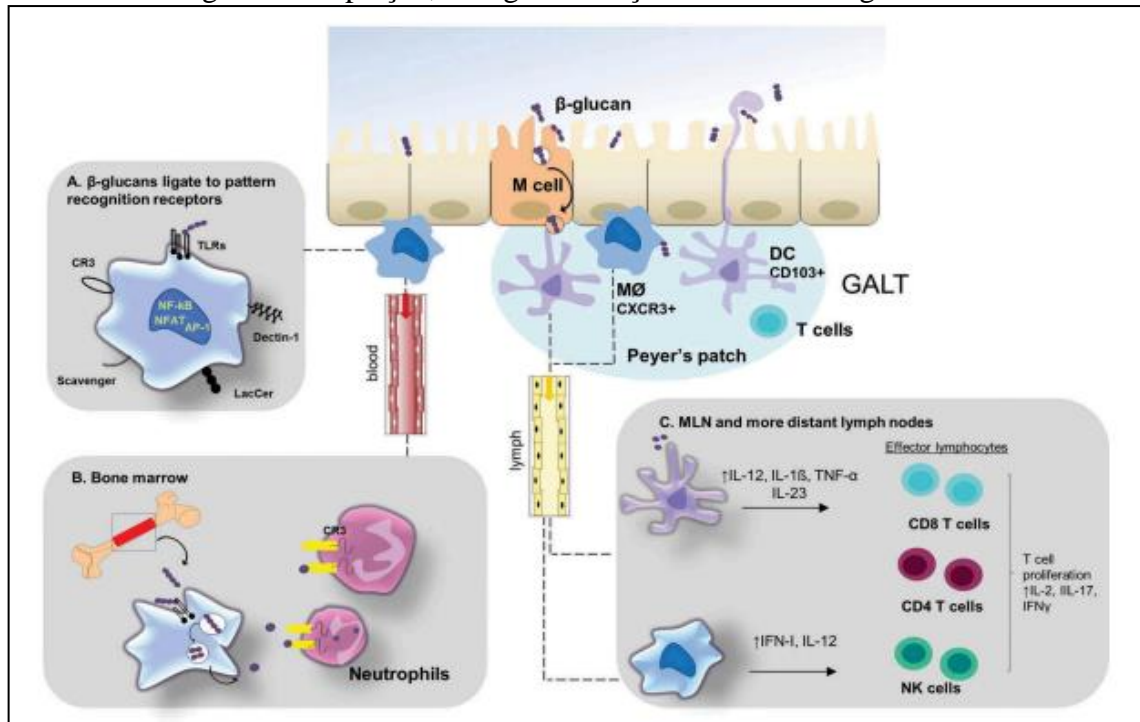
solúveis das glucanas, as quais vão se ligar ao receptor do complemento 3 (CR3) presente em outrotipos celulares.

Uma vez passando pelo epitélio intestinal, a betaglucana pode atingir órgãos linfoides distantes via sangue ou linfa, fazendo uso de subconjuntos de células imunes inatas ou transporte livre de células. Ao chegar à medula óssea, baço e gânglios linfáticos, as betaglucanas fragmentadas dão suporte à diferenciação de linfócitos efetores, como células NK e células T CD8<sup>+</sup> (De GRAAFF *et al.*, 2018). Esses processos de distribuição tecidual da betaglucana são sustentados pelos achados de Hong e colaboradores (2004), que em estudos administrando oralmente partículas de betaglucanas marcadas com fluorocromos a camundongos, identificaram fluorescência em macrófagos esplênicos e linfonodos no terceiro dia após administração e no quarto dia nos macrófagos da medula óssea.

Em todo este processo, há que se atentar que as betaglucanas fragmentadas podem não se ligar ou estimular os mesmos receptores que as betaglucanas de origem. De fato, pequenas partículas de betaglucana, com um comprimento de estrutura inferior a sete unidades de glicose não podem se ligar aos receptores de dectina-1 (ADANS *et al.*, 2008), e betaglucanas solúveis não podem iniciar o agrupamento de dectina-1 em sinapses imunológicas e, conseqüentemente, não podem ativar este receptor (De GRAAFF *et al.*, 2018). Tal condição, em muitos casos, pode explicar as diferenças biológicas identificadas entre vias orais e parenterais de betaglucana (Vetvicka; Vetvickova, 2008).

De forma sucinta, a modulação imune mediada por  $\beta$ -glucanas administrada oralmente para monogástricos requer: (1) absorção intestinal; (2) tráfego através do corpo; e (3) ativação de células imunes em órgãos linfoides distantes, o que pode visualizado na figura 4.

Figura 4 - Captação, tráfego e ativação imune de betaglucanas.



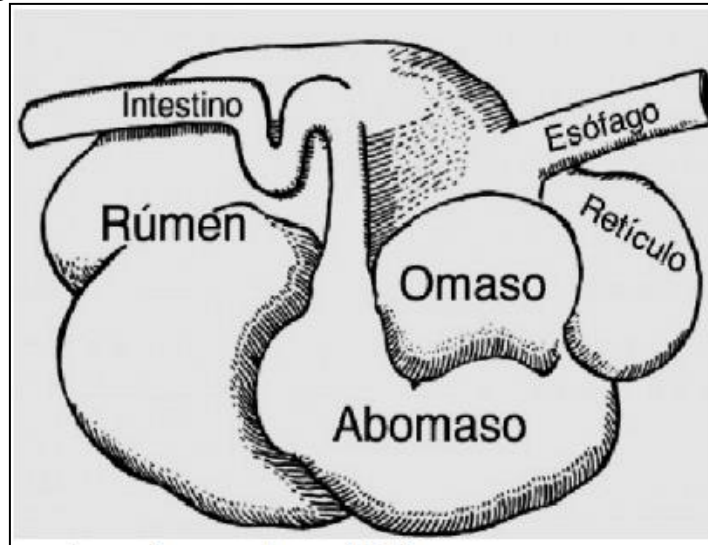
Legenda: (A) Betaglucanas ligam-se às células imunes inatas por meio de PPRs, geralmente resultando em sinalização por vias conservadas e produzindo ativação celular. (B) Dentro da medula óssea, os produtos de degradação de grandes betaglucanas ligam-se a CR3 nos neutrófilos, resultando em sua ativação. (C) Dentro dos órgãos linfoides, células dendríticas e macrófagos produzem uma variedade de IFNs tipo I e citocinas pró-inflamatórias, culminando em diferenciação aumentada de linfócitos efetores.

Fonte: de Graaff et al (2018).

#### 2.4. Peculiaridades do sistema digestivo de ruminantes que podem impactar na estabilidade da betaglucana

Simplificando, tanto a anatomia quanto a fisiologia digestiva dos ruminantes são marcadamente diferentes dos animais monogástricos. Previamente à digestão química do alimento, os ruminantes possuem um conjunto de quatro compartimentos denominados de rúmen, retículo, omaso e abomaso, onde ocorre uma série de processos fermentativos (figura 5) (PARISH *et al.*, 2009).

Figura 5 - Esquema do sistema digestivo de ruminantes, com foco nos compartimentos do estômago (rúmen, retículo, omaso e abomaso).



Fonte: imagem adaptada e extraída do arquivo: PSF A-10005.png, Domínio público.  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3541895>.

O compartimento ruminoreticular é habitado por uma população de microorganismos que incluem bactérias estritamente anaeróbicas, protozoários ciliados, fungos anaeróbicos e arqueias. No rúmen esses microorganismos são responsáveis pela fermentação e digestão de cerca de 50 a 65% do amido e do açúcar solúvel, em que, principalmente, bactérias digerem celulose das paredes celulares vegetais, digerem amido complexo, sintetizam proteínas a partir de nitrogênio não proteico e sintetizam vitaminas do complexo B e vitamina K (PARISH *et al.*, 2009). Outra característica peculiar do sistema digestivo de ruminantes é a presença de glândulas salivares com elevada capacidade de produção de saliva rica em bicarbonato, que tem como função tamponar o conteúdo ruminal para mantê-lo em uma condição de pH estável (6,2-7,2) e compatível com os processos fermentativos (CHOLEWINSKA *et al.*, 2020). Dentre todas as bactérias do sistema digestivo de ruminantes, estão presentes os seguintes filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Fibrobacteres*, e em menor quantidade *Tenericutes* e *Actinobacteria* (KHAFIPOUR *et al.*, 2016), que contribuem para a decomposição de resíduos vegetais, polissacarídeos, celulose, ácidos graxos superiores e compostos aromáticos no rúmen. O filo Fibrobacter, ao qual pertence a *Fibrobacter succinogenes*, é constituído por bactérias celulolíticas cujo crescimento no rúmen é assegurado pelas betaglucanas, e sua decomposição resulta na formação dos ácidos fórmico, acético e succínico (CHOLEWINSKA *et al.*, 2020). Destaca-se que esses compartimentos biológicos também podem estar colonizados por uma vasta microbiota que podem conter betaglicosidases capazes de clivar ligações  $\beta$  (1,3),  $\beta$  (1,4),  $\beta$  (1,6) (BADHAN *et al.*, 2022,

GAO *et al.*, 2022, BELZECKI *et al.*, 2012), o que pode impactar significativamente na estabilidade química da betaglucana.

A partir do processo de degradação ruminal dos polímeros da parede celular de vegetais, são produzindo ácidos graxos voláteis (AGVs), como: ácido acético (usado para síntese de lipídeos), ácido propiônico (usado para síntese de glicose) e ácido butírico. Esses AGVs servem como principal fonte de energia e têm impacto direto nos parâmetros fisiológicos do animal. Os gases produzidos no rúmen incluem dióxido de carbono, metano e sulfeto de hidrogênio, e ao separarem-se da fração líquida do conteúdo ruminal, são liberados na atmosfera por movimentos de eructação (PARISH *et al.*, 2009, CHOLEWINSKA *et al.*, 2020).

Segundo Cholewinska e colaboradores (2020), o retículo possui como principal função coletar as partículas menores da digesta e movê-las para o omaso, enquanto as partículas maiores permanecem no rúmen para continuar o processo de fermentação. Por sua vez, o omaso tem como principal função absorção de nutrientes da ração e da água. Já o abomaso, se assemelha ao estômago químico de monogástricos, produzindo ácido clorídrico e enzimas digestivas, como a pepsina.

### **3. HIPÓTESE**

Baseado nas diferenças anatomofiológicas do sistema digestivo de ruminantes e de monogástricos, bem como pelo fato dos mecanismos de absorção e ativação do sistema imune pela betaglucana, serem dependentes de características conformacionais, estruturais, de peso molecular, e de densidade de ligações do tipo  $\beta$ , foi hipotetizado que a betaglucana possa estar sofrendo modificação química no rúmen, pela ação da microbiota residente nesse compartimento digestivo.

### **4. OBJETIVO**

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar as modificações químicas intraruminais de quatro produtos de betaglucana extraídos de uma mesma estirpe de *S.cerevisiae*, com variações no meio de cultura e no processo de extração, a fim de gerar informações que auxiliem na compreensão de parâmetros que possam alterar a biodisponibilidade deste imunofármaco quando administrado para bovinos.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Fontes de betaglucana, quitina e celulose

Quatro produtos derivados de levedura foram utilizados neste experimento, obtidos pela purificação industrial da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Biorigin, Lençóis Paulista, São Paulo, Brasil). Três produtos foram produzidos sob condição de fermentação controlada enquanto que o quarto produto foi obtido da mesma levedura, contudo com crescimento em condições anaeróbicas em caldo de cana-de-açúcar. Após a purificação industrial, o cultivo de leveduras foi submetido à autólise onde as enzimas intracelulares são ativadas por condições de processamento apropriadas, resultando em uma degradação parcial das estruturas da parede celular, seguida de centrifugação e separação do extrato de levedura da parede celular da levedura (Podpora *et al.*, 2016). Por meio desse processamento, foi obtido o produto purificado padrão de parede celular de levedura (BG1) com concentração de betaglucana de 83%. Posteriormente, a parede celular purificada da levedura foi submetida a um processamento de hidrólise química por ácidos (Peat *et al.*, 1961, Ogawa *et al.*, 1994), a fim de solubilizar parcialmente a camada externa de betaglucana para obter o produto solúvel *Yeast Cell Wall* (BG2) com concentração de betaglucana de 45%. Para o terceiro produto (BG3), paralelamente a este processo, outras etapas de centrifugação foram realizadas, com concentração de betaglucana de 88%. O quarto produto (BG4) passa pelo mesmo processo do BG3, porém a *S. cerevisiae* cresce em condições anaeróbicas e caldo de cana, com concentração de betaglucana de 91%. Maiores detalhes dos processos de extração e purificação não puderam ser fornecidos devido a questões de segredo industrial. A quitina (448877 Sigma-Aldrich) e os nanocristais de celulose foram gentilmente fornecidos pela Embrapa Gado de Leite.

### 5.2. Animais e delineamento experimental

Os experimentos *in situ* foram conduzidos com duas vacas Holandesas permanentemente fistuladas no rúmen, para experimentos de nutrição animal. Os animais receberam água *ad libitum* e foram alimentados com dieta de manteça baseada em silagem de milho complementada com ração a base de milho e soja, haja vista que a base de silagem é o volumoso mais usado em bovinos leiteiros em confinamento. A análise composicional da dieta foi realizada em duplicata, no laboratório de análise de alimentos da Embrapa Gado de Leite e encontra-se em anexo na Tabela 2.



Tabela 2 - Composição centesimal da dieta utilizada no experimento.

Análise	Amostra 1	Amostra 2	Média	Desvio Padrão
ASE (%)	92,85	92,37	92,61	0,24
CZ (%)	5,14	4,60	4,87	0,27
CZ-FDN (%)	0,90	1,00	0,95	0,05
DIV-FDN (%)	40,96	45,20	43,08	2,12
DIVMS (%)	78,64	77,57	78,11	0,54
EB (Kcal/Kg)	4.327,41	4.348,81	4.338,11	10,70
EE saq. (%)	2,78	2,45	2,62	0,16
FDA (%)	22,12	21,57	21,85	0,28
FDN (%)	42,54	44,42	43,48	0,94
Lig (%)	0,29	0,08	0,19	0,11
PB (%)	6,02	5,49	5,76	0,26
PB-FDA (%)	0,57	0,60	0,59	0,02
PB-TBF (%)	2,02	1,99	2,01	0,02
PB-TCA (%)	2,17	2,10	2,14	0,03
PB-FDN (%)	1,40	1,41	1,41	0,01

Nota: ASE: Amostra seca em estufa, CZ: cinzas, CZ-FDN: cinzas de fibra em detergente neutro, DIV-FDN: digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro, DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca, EB: energia bruta, EE: extrato etéreo, FDA: fibra em detergente ácido, FDN: fibra em detergente neutro, Lig: lignina, PB: proteína bruta, PB-FDA: proteína bruta da fibra em detergente neutro, PB-TBF: proteína bruta em tampão borato fosfato, PB-TCA: proteína bruta em ácido tricloroacético, PB-FDN: proteína bruta em fibra em detergente neutro.

Fonte: Do autor (2022).

### 5.2.1 Experimento 1:

Por possuir maior concentração de betaglucana e por ser um coproduto do processo de produção de bioenergia amplamente utilizado do Brasil, o experimento 1 teve por objetivo identificar as modificações químicas que ocorrem na betaglucana (BG4) no ambiente ruminal. Para isso, foram incubados três gramas de BG4 no rúmen de bovinos, com auxílio de sacos de nylon (ANKOM<sup>®</sup> F57) (Grove *et al.*, 2006), em duplicata, por um período de 48 horas. Foram coletadas amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho médio, Raman nos tempos 0, 24 e 48 horas.

### 5.2.2 Experimento 2:

O experimento 2 teve por objetivo avaliar as diferenças de estabilidade ruminal de betagluconas produzidas com variações nos meios de cultura e nos processos de extração. Para tanto foram utilizadas quatro fontes de betaglucana distintas (BG1, BG2, BG3 e BG4). Para isso, foram incubados 0,5 gramas de betaglucana no rúmen de bovinos, de cada uma das respectivas fontes de betaglucana, com auxílio de sacos de nylon (ANKOM<sup>®</sup> F57), em duplicata. Previamente à incubação e imediatamente após a incubação, todas as amostras foram secas em estufa de secagem a 65 °C por 24 horas para determinação da matéria seca.

Foram coletadas amostras nos tempos de incubação 0, 6, 12, 24, 48, 72, 120 e 168h, para análise de espectroscopia no infravermelho e espectroscopia UV-vis.

### **5.3. Análise por espectroscopia no infravermelho**

No experimento 1 os espectros foram obtidos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier usando um espectrômetro FTIR Perkin Elmer operando no modo de absorção. Os espectros foram obtidos na faixa de 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e 32 varreduras foram obtidas usando pastilhas de KBr. Por sua vez, no experimento 2, os espectros foram obtidos em espectrômetro infravermelho Bruker modelo Alpha, na região de interesse, utilizando acessório de reflectância total atenuada (ATR) in situ, com 128 varreduras e resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Todos os espectros foram tratados com o programa Origin 2021.

### **5.4. Análise por espectroscopia Raman**

Os espectros foram obtidos em equipamento FT Raman da Bruker modelo FRS100 equipado com detetor de germânio, resfriado com  $\text{N}_2$  líquido, e excitados com laser de 1064 nm de Nd:YAG, com potência de ca. 75 mW na amostra, com média de 512 varreduras, e 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução espectral, em faixa de 4000 a 50  $\text{cm}^{-1}$ .

### **5.5. Medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As imagens foram obtidas em Microscópio Eletrônico Hitachi TM 3000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan, com voltagem de aceleração de 15 kV, sob baixo vácuo, com diferentes ampliações. As amostras foram fixadas no porta-amostra com fitas de carbono.

### **5.6. Método de ensaio colorimétrico de betaglucanas utilizando vermelho do congo**

O método foi desenvolvido com base na interação química específica que ocorre entre o corante vermelho do Congo e as  $\beta$ -D-glucanas. Como consequência dessa interação ocorre o deslocamento do espectro eletrônico do vermelho do congo para maiores comprimentos de onda, o que é associado à concentração de betaglucanas (SEMEDO *et al.*, 2015). Assim, uma solução aquosa de vermelho do congo a 490  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e soluções de 0,01 g das amostras (quitina, celulose, BG1, BG2, BG3 e BG4) em 10 mL de solução aquosa contendo 7 % de hidróxido de sódio e 12 % de ureia foram preparadas. Contudo, para a solubilização das amostras foi necessário realizar o processo de congelamento ( $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ) e descongelamento uma vez ao dia até se completar 6 dias (ABDELAZIZ *et al.*, 2022). Após as amostras solubilizadas, foram misturados 3 mL das suas respectivas soluções com 1 mL da solução de vermelho do congo, as soluções resultantes foram agitadas e os espectros eletrônico foram obtidos utilizando um equipamento da marca PG *Instruments* modelo T70. Por fim, para a

obtenção do espectro eletrônico do vermelho do congo misturou-se 1 mL de sua solução com 3 mL da solução NaOH/ureia.

## 6. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

### 6.1. Experimento 1

O Brasil é o maior produtor mundial de álcool a partir de cana de açúcar, uma rota para produção de biocombustível verde e altamente sustentável (Luz *et al.*, 2009). O *S. cerevisiae* é a levedura mais eficiente para efetuar esse processo fermentativo e, por consequência, a betaglucana derivada desse processo industrial apresenta ampla disponibilidade para seu uso na produção animal como imunofármaco. Assim, o estudo inicial ocorreu com a amostra de betaglucana extraída a partir de fermentação alcoólica.

O uso da betaglucana como um imunofármaco é dependente de sua absorção e capacidade de ligar-se a receptores celulares do sistema imune. Aparentemente, as betaglukanases podem ser absorvidas no intestino delgado ativamente por transcitose mediada por receptores dectina-1 ou passivamente por via paracelular (Hino *et al.*, 2020). Por sua vez, a ativação do sistema imune é mediada pela ligação da betaglucana aos receptores celulares do tipo dectina-1, Toll-like 2 e 4 (TLR-2 e 4), lactosilceramida e complemento 3 (CR-3) (KIM *et al.*, 2011; Hino *et al.*, 2020). Ambas as características são altamente influenciadas pelo peso molecular, grau de ramificação e conformação espacial da cadeia polimérica da betaglucana, sendo estes parâmetros associados à sua potência biológica (Kaur *et al.*, 2020). De uma forma geral, considera-se que cadeias poliméricas com menos de sete unidades monoméricas ou de baixo peso molecular apresentam pouca, ou nenhuma potência biológica (ADANS *et al.*, 2008). Isso se explica face às especificidades de interações físicoquímicas necessárias para ocorrer a ativação dos receptores pela betaglucana, como por exemplo a que ocorre entre os resíduos de aminoácidos Trp221 e His223 e a betaglucana na dectina-1 (PALMA *et al.*, 2006). Interações similares também são necessárias para ativar os receptores TLR 2 e 4 (LEBRON *et al.*, 2003), CR3 (XIA *et al.*, 1999) e lactosilceramida (JIMENEZ-LUCHO *et al.*, 1990).

Tanto a potência biológica quanto o tipo de resposta do sistema imune variam em função da via de aplicação da betaglucana (*i.e.* oral ou parenteral) (Vetvicka e Vetvickova, 2008). Essa diferença pode ser atribuída a um processo de clivagem da cadeia polimérica da betaglucana durante seu trânsito intestinal. Em suínos, que possuem sistema digestivo monogástrico, estima-se que enzimas hidrolíticas oriundas de bactérias do trato gastrointestinal superior são capazes de induzir a despolimerização da betaglucana em até

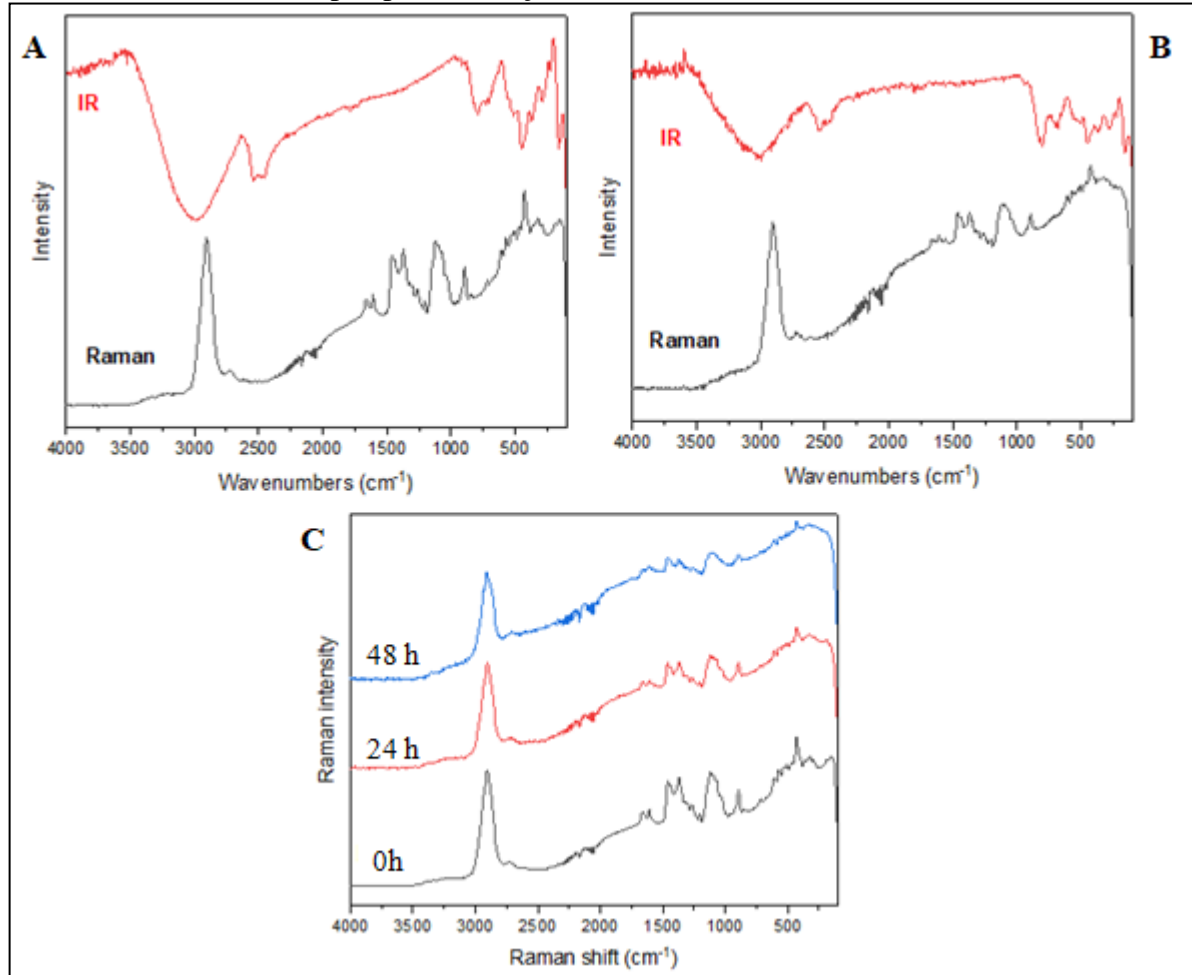
80% até sua chegada ao final do intestino delgado (Holtekjølen *et al.*, 2014). Na literatura, não existem trabalhos avaliando a estabilidade da betaglucana em ambiente ruminal. Todavia é de se estimar que a betaglucana esteja exposta a um ambiente mais adverso que o sistema digestivo de monogástricos, uma vez que dados de metagenômica sugerem que o rumem é colonizado por uma grande variedade de microorganismos com potencial de produção endo e exo betaglicosidases do tipo  $\beta$  (1,3),  $\beta$  (1,4),  $\beta$  (1,6) (BELZECKI *et al.*, 2012, BADHAN *et al.*, 2022, GAO *et al.*, 2022,).

Para avaliar a estabilidade da betaglucana no rúmen de bovinos, foram obtidos os espectros Raman e infravermelho do biopolímero previamente à sua incubação ruminal, aos quais podem ser observados na Figura 6 (A). A banda de maior intensidade em ambos os espectros pode ser atribuída aos modos de vibração de ligações O-H das estruturas glicosídicas, com absorção na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$ . As bandas em  $1459$  e  $1371\text{ cm}^{-1}$  são referentes a modos típicos de esqueleto de polissacarídeos, ou ainda bandas em  $1657$  e  $1608\text{ cm}^{-1}$ , referentes a modos de vibração das ligações C=O e C=C, respectivamente. Outras bandas presentes podem também ser atribuídas, como  $1119$  e  $892\text{ cm}^{-1}$ , referentes a modos acoplados  $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$  e  $\delta(\text{C-C-H}) + \delta(\text{C-O-C})$ , respectivamente. Entretanto, a banda mais marcante pode ser observada em  $429\text{ cm}^{-1}$ , referente ao modo típico de deformação da ligação (C-C-C) da estrutura glicosídica (ALVES *et al.*, 2016, EDWARDS *et al.*, 1997, ALMEIDA *et al.*, 2010, BOUTROS *et al.*, 2022, DU, *et al.*, 2012). Com os dados espectroscópicos obtidos, principalmente baseados nos espectros Raman, não é possível diferenciar se a betaglucana apresenta em alguma forma estrutural específica, como  $\beta$  (1,3) ou  $\beta$ (1,6) glucana, indicando fortemente que existe uma mistura das duas formas.

Na Figura 6 (B), podemos observar os espectros Raman e infravermelho da amostra de betaglucana após incubação em 48 horas. Nesta figura a qualidade dos espectros fornece um indicio de hidrólise sofrida pela amostra, tanto em termos de intensidades relativas quanto em termos de posição de bandas. É bem conhecido da literatura que amostras orgânicas, sob efeitos externos que levam à deterioração da sua qualidade estrutural, mostram essa degradação nos seus respectivos espectros (KHATIBI *et al.*, 2018). Em termos de comparação, os espectros Raman das amostras de betaglucana pré-incubação ruminal, 24 horas e 48 horas de incubação ruminal, podem ser observados na Figura 6 (C). Nesta, a banda em  $2900\text{ cm}^{-1}$ , referente ao modo vibracional de estiramento da ligação C-H, nos três espectros apresenta intensidade similar. Entretanto, conforme o tempo de incubação evolui, percebe-se a diminuição da intensidade das demais bandas. Esse achado sugere fortemente que a amostra está sofrendo um processo de degradação significativo ao longo do tempo.

Corroborando com essa interpretação, a forma de várias das bandas também sofre mudanças, sendo um forte indicativo do processo de degradação.

Figura 6: Espectros Raman e Infravermelho da betaglucana pré incubação ruminal e em diferentes tempos pós incubação ruminal.



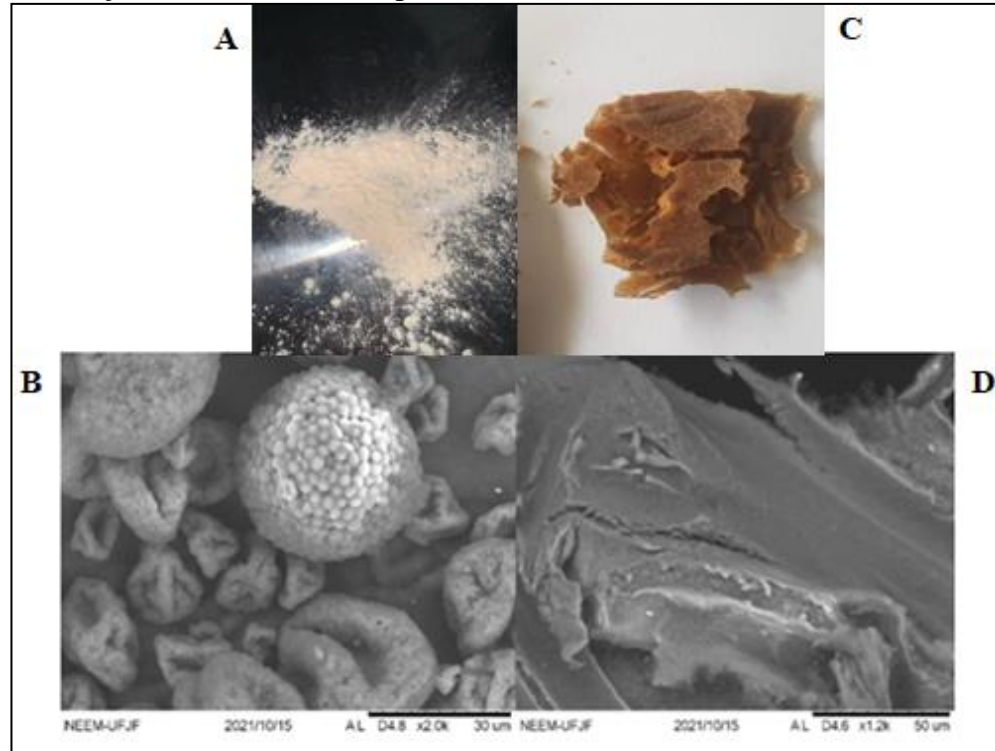
Legenda: (A) Espectros Raman e Infravermelho da betaglucana pré incubação ruminal. (B) Espectros Raman e infravermelho da amostra de betaglucana após 24 horas de incubação ruminal. (C) Espectros Raman de betaglucana nos tempos 0h, 24h e 48h de incubação ruminal.

Fonte: Do autor (2022).

Processos de degradação das cadeias poliméricas por ação de microorganismos podem induzir alterações morfológicas em escala micrométrica do polímero *bulk* (CANGEMI *et al.*, 2006). Assim, para avaliar os efeitos do microambiente ruminal sobre a morfologia da betaglucana, foram obtidas micrografias eletrônicas de varredura pré-introdução no rúmen, (Figura 7 B) e após 24 horas de exposição ao ambiente ruminal (Figura 7 D). Na Figura 7 A observa-se a amostra macroscopicamente em forma de pó e na Figura 7 B (MEV) pode-se observar a presença de estruturas esferoides e rugosas com diâmetro variando entre 5 e 50 micrometros. Estruturas com morfologia semelhante são relatadas por Bastos e colaboradores

(2015), processos fermentativos alcoólicos fazem com que leveduras produzam paredes celulares mais espessas e com cadeias de betaglucanas com elevado grau de ramificação, as quais podem ser visualizadas pela técnica de MEV com estruturas esferoides irregulares. Por sua vez, as betaglucanas expostas a 24 horas de ambiente ruminal observa-se intensa mudança na morfologia da betaglucana, com esta assumindo uma morfologia microscópica amorfa tanto macroscopicamente (Figura 7 C) quanto na MEV (Figura 7 D). Esta mudança de morfologia pode ser explicada por uma reorganização das cadeias de betaglucana em função de alterações bioquímicas do ambiente ruminal, de um processo de plastificação do polímero ou de um processo de hidrólise. De fato, a desorganização da tripla hélice helicoidal das betaglucanas de alto peso molecular em estruturas com formato de caracol pode ocorrer em função de mudanças no meio líquido em que a betaglucana se encontra, mas este parece ser um processo pouco provável de ocorrer no rúmen, uma vez que necessita de pH superior a 10 (MANABE *et al.*, 2021). Outras conformações da betaglucana que podem estar associadas ao meio em que elas se encontram, são as formas de dupla hélice, cadeias aleatórias, bastão e agregados (WANG *et al.*, 2017). Apesar de não poder ser descartado, por não ter sido identificada a presença de novas bandas nas análises espectroscópicas, a plasticização por substâncias de baixo peso molecular é um fenômeno que a betaglucana pode sofrer e impactar em sua morfologia (SAGNELLI *et al.*, 2017). Por outro lado, a ação de betaglicosidasas da microbiota ruminal é um mecanismo de degradação da betaglucana altamente provável de estar ocorrendo. Essa hipótese é sustentada tanto pelo deslocamento e pela redução das intensidades de bandas das bandas espectrais de infravermelho e Raman do material submetido às condições ruminiais, quanto pela vasta literatura que relata a ocorrência de microbiota produtora de endo e exoglucanases no rúmen (BADHAN *et al.*, 2022, GAO *et al.*, 2022, BELZECKI *et al.*, 2012), inclusive destacando que os oligossacarídeos mais longos são melhores substratos para atuação de *exo-β-1,3-glucanases* extraídas de rumen (Kalyani *et al.*, 2021).

Figura 7– Imagens da betaglucana antes (macroscopia) (A) e (MEV) (B) e após 24 horas de incubação ruminal (macroscopia) (C) e (MEV) (D).



Fonte: Do autor (2022).

## 6.2. Experimento 2

As betaglucanas estão entre os principais componentes da parede celular do *S. cerevisiae* e fazem contato direto com o meio extracelular. Tal condição faz com que os estresses abióticos impactem qualitativa e quantitativamente em sua biossíntese. Assim, fatores como temperatura, pH, tempo de cultivo e fonte de carbono para crescimento podem impactar na quantidade de betaglucana produzida, em seu peso molecular médio, na densidade de ligações do tipo beta, na relação de ligações alfa/beta, no grau de ramificação e presença de ligações beta (BASTOS *et al.*, 2015; VARELAS *et al.*, 2015; NARUEMONETA *et al.*, 2013). Por sua vez, o processo de extração das betaglucanas envolve condições extremas de pH, temperatura e ação mecânica, que pode promover a separação de subgrupos de betaglucana, ou mesmo hidrólise da cadeia polimérica original em subunidades de peso molecular mais baixos (MAHESHWARI *et al.*, 2017). Assim, considerando o impacto das variáveis supracitadas nas características finais da betaglucana, delineou-se um experimento para avaliar as consequências na estabilidade ruminal tanto de variações na fonte de carbono utilizada para o crescimento da levedura, quanto no processo de extração da betaglucana de uma única estirpe de *S. cerevisiae*. Previamente à incubação ruminal, quatro amostras comerciais de betaglucana foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho: BG1, BG2, BG3 e BG4.

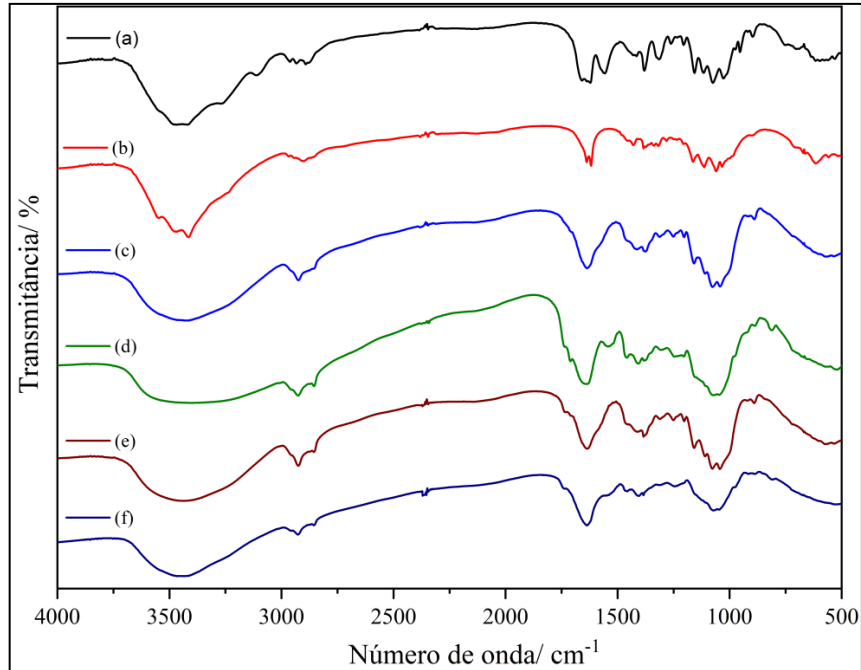
### 6.2.1. Espectroscopia no Infravermelho para quatro betaglucanas obtidas por diferentes processos de extração

A Figura 8 apresenta os espectros de absorção no infravermelho das amostras estudadas e a tabela 3 a tentativa de atribuição das bandas de acordo com a literatura (CÁRDENAS *et al.*, 2004; OH *et al.*, 2005; NOVÁK *et al.*, 2012; SYNYTSYA; NOVAK, 2014; KOVALEVA *et al.*, 2016; LIU; KIM, 2017; MILHOMENS *et al.*, 2018; GIEROBA *et al.*, 2020). Os compostos comerciais BG1, BG2, BG3 e BG4 são constituídos majoritariamente por betaglucanas, no entanto em função do seu processo de purificação podem apresentar impurezas associadas aos ácidos graxos, lipídeos, proteínas, entre outros (BZDUCHA-WRÓBEL *et al.*, 2020). No entanto, a presença de quitina como impureza também é relatada, pois essa constitui a parede celular dos fungos e também pode apresentar-se ligada a  $\beta$ -glucana covalentemente (CHEN *et al.*, 2021; SIETSMA; WESSELS, 1979). A celulose também pode estar presente como impureza dependendo do processo de obtenção da betaglucana, por exemplo, se for fabricada a partir da cana de açúcar (PAGLIUSO *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos a fim de identificar as impurezas nas diferentes amostras comerciais. Assim, nos espectros do BG2 e BG3 é possível observar dois ombros pronunciados em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$  e no BG1 apenas um, que não são associados à estrutura da betaglucana e sim a impurezas como proteínas e ácidos graxos (PENGKUMSRI *et al.*, 2016). O mesmo é observado no espectro do BG4, no entanto de forma menos pronunciada, indicando uma menor presença desses compostos. Além disso, no espectro do BG2 e BG3 observa-se que as bandas em  $2927$  e  $2853\text{ cm}^{-1}$  se apresentam-se mais intensas, indicando novamente uma maior quantidade de impurezas.



Figura 8 - Espectro de absorção no infravermelho da quitina (a), celulose (b), BG4 (c), BG2 (d), BG3 (e) e BG1 (f).



Fonte: Do autor (2022).

Nos espectros de todas as amostras verifica-se a presença da banda em torno de  $1635\text{ cm}^{-1}$  que não é característica da betaglucana e pode ser associada a  $\delta(\text{OH})$  de moléculas de água devido à umidade das amostras ou a presença de quitina nas amostras. Contudo, a indicação da presença de quitina nas amostras pode ser observada na região espectral em torno de  $1570\text{ cm}^{-1}$ . No espectro do BG1 e do BG2 nota-se uma banda bem definida e um ombro pronunciado, respectivamente, no entanto para as outras amostras ocorre apenas um ombro pouco pronunciado. Em relação à celulose não é possível propor sua presença na composição das amostras comerciais, uma vez que não se observa uma banda característica sua nos espectros das amostras.

Tabela 3 - Tentativa de atribuição vibracional baseada em polissacarídeos similares e cálculos de estrutura eletrônica da literatura (continua).

Quitina	Celulose	BG4	BG2	BG3	BG1	Tentativa de atribuição
3347	3541/3473/3414	3430	3457		3233	$\nu(\text{OH})$
3266/310						$\nu_s(\text{NH})$
0						
2962						$\nu_{\text{as}}(\text{CH}(-\text{CH}_3))$
2931						$\nu_{\text{as}}(\text{CH}(-\text{CH}_2-))$
2891						$\nu_s(\text{CH}(-\text{CH}_2-))$
	2902/2859	2925	2927		2926	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
		2861	2853		2853	$\nu_s(\text{CH}_2)$
		1707	1734/1	1738/1	1739	$\nu(\text{C}=\text{O})$
			711	707		
1658		1635	1641	1635	1633	$\nu(\text{C}=\text{O})$
	1633/1615					$\delta(\text{OH})$
1559/131						$\delta(\text{NH})$ e $\nu(\text{CN})$
1						
		1459	1456	1456	1456	$\delta(\text{O}-\text{CH}_3)$ , $\delta(\text{HCH})$ , $\delta(\text{HOC})$ e $\delta(\text{CH})$
	1425/1383/1339/ 1319/1278					$\delta(\text{CH}_2)$
1414						$\delta_s(\text{CH}(-\text{CH}_2-))$
		1375	1377	1379	1386	$\delta(\text{CH})$ e $\delta(\text{COH})$
1376						$\delta_{\text{as}}(\text{CH}(-\text{CH}_2-))$
		1315	1307	1311	1311	$\delta(\text{CH})$ e $\delta(\text{OH})$
1262						$\delta(\text{NH})$
		1251/1	1245/1	1249/1	1246	$\delta(\text{CCH})$
		201	206	204		
1157	1161	1159	1152	1159	1157	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ da ligação glicosídica
1114/1073	1202/1118/1058/ /1030	1418/1	1071/1	1414/1	1408/1	$\nu(\text{C}-\text{O})$
	1013	077	414	077	070	
		1105	1110	1107	1110	$\nu(\text{C}-\text{O})$ e $\nu(\text{C}-\text{C})$
953						$\delta(\text{CH}_3)$

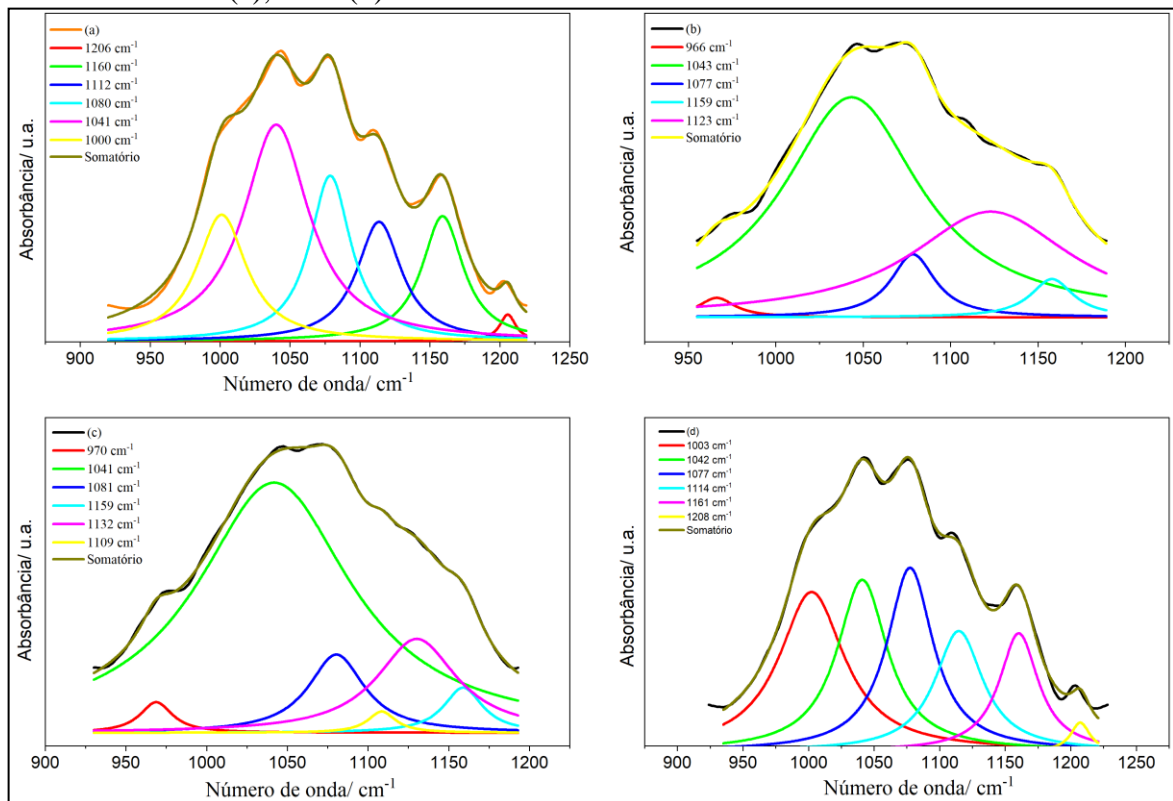
	1043	1043	1041	1046	$\delta(\text{CC})$ , $\delta(\text{COH})$ , $\delta(\text{CH})$
896	890	883	887	892	$\delta(\text{HCC})$ , $\delta(\text{HCO})$ , $\delta(\text{CH})$ e Ligação $\beta$ Ligação $\beta$

---

Fonte: Do autor (2022). (conclusão).

A região do espectro de absorção no infravermelho entre 900 e 1200  $\text{cm}^{-1}$  têm sido utilizada para a diferenciação das ligações  $\beta(1,3)$ ,  $\beta(1,4)$  e  $\beta(1,6)$ , Contudo, quando a largura de uma banda é maior do que a adjacente a distinção entre elas é dificultada, mesmo aumentando a resolução do instrumento. No entanto, foi demonstrado que procedimentos matemáticos podem ser usados para extrair as informações estruturais ocultas (GALICHET *et al.*, 2001). Neste sentido, a Figura 9 mostra os espectros deconvoluídos utilizando a curva Lorentziana.

Figura 9 - Deconvolução dos espectros de absorção no infravermelho do BG3 (a), BG2 (b), BG1 (c), BG4 (d).



Fonte: Do autor (2022).

A banda em torno de 990  $\text{cm}^{-1}$  é associada à ligação  $\beta(1,6)$  e pode ser identificada nos espectros das amostras BG3 e BG4 contribuindo de forma significativa no espectro, mas nos espectros do BG1 e BG2 essas bandas aparecem de forma menos intensa. As bandas em torno de 1160, 1120, 1075  $\text{cm}^{-1}$  são associadas à ligação  $\beta(1,6)$  e podem ser visualizadas nos espectros de todas as amostras. A primeira e terceira aparecem com maior contribuição nos espectros do BG3 e BG4 e a segunda com a mesma contribuição em todas as amostras.

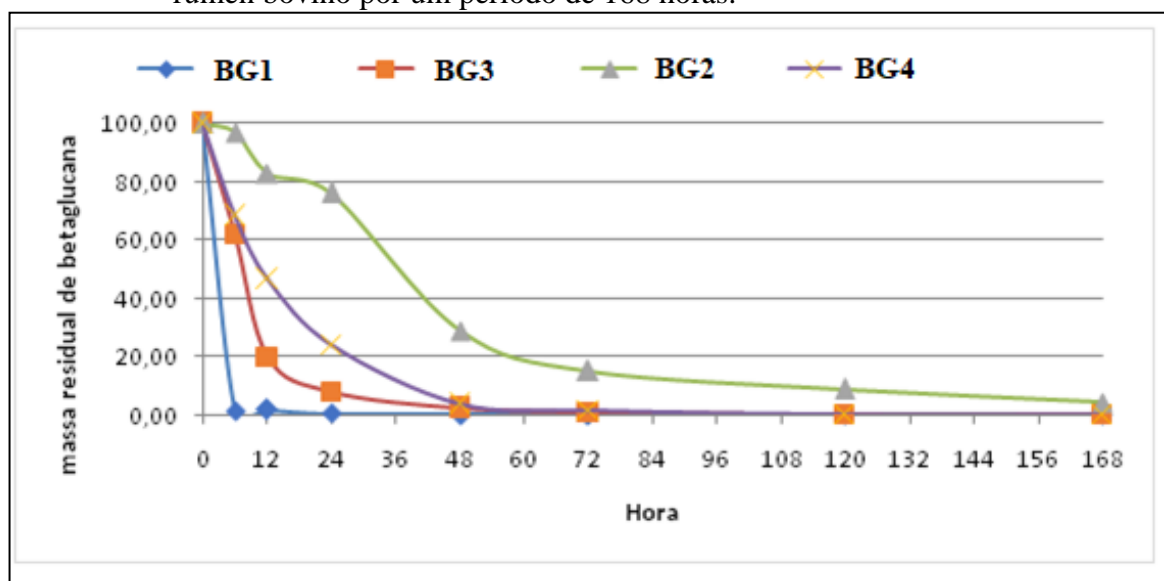
Em relação às bandas que identifiquem a ligação  $\beta(1,4)$  há controvérsias na literatura, pois uma referência (PENGKUMSRI *et al.*, 2016) indica que a banda em torno de 1025  $\text{cm}^{-1}$

está associada a essa ligação  $\beta(1,4)$  e outra (GIEROBA *et al.*, 2022) demonstra esta banda no curdlan, glucana com a presença apenas de ligação  $\beta(1,3)$ . A banda em  $1042\text{ cm}^{-1}$  aparece associada a  $\beta(1,3)$  (PENGKUMSRI *et al.*, 2016) e a  $\beta(1,4)$  (CHAIYASUT *et al.*, 2018) o que torna inconsistente seu uso na identificação das ligações.

Contudo, a partir dos resultados pode-se inferir que as amostras BG3 e BG4 apresentam uma maior quantidade de glucanas que a BG1 e BG2, mesmo levando em conta a possível contribuição da quitina nesta análise, uma vez que as duas últimas apresentaram uma maior possibilidade de presença de quitina. Essa conclusão está em concordância com os dados de concentração de betaglucana fornecida pelo fabricante.

Uma vez caracterizada, todas as amostras comerciais de betaglucanas foram incubadas no rúmen bovino por um período de 168 horas para avaliar a perda de massa e estimar sua estabilidade (Figura 10).

Figura 10 - Comparação da massa residual entre as quatro fontes de betaglucana incubadas no rúmen bovino por um período de 168 horas.



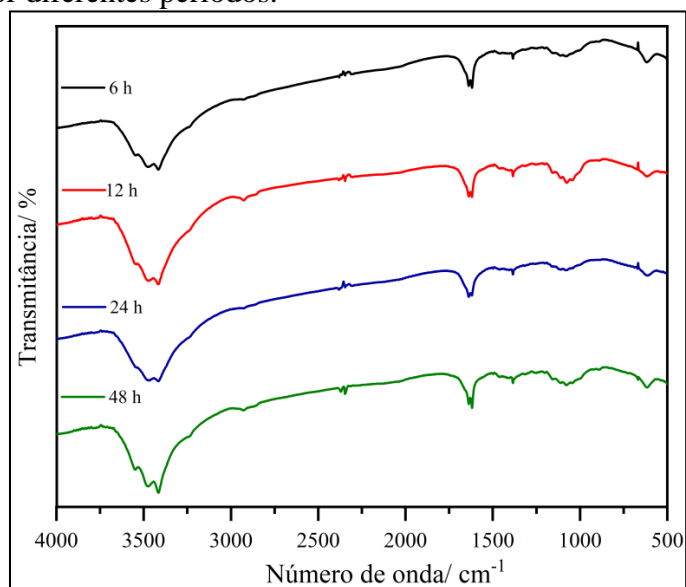
Fonte: Do autor (2022).

A amostra BG1 foi a que apresentou perda de massa mais rápida, não sendo mais detectada no rúmen seis horas após incubação. Isso sugere que o material é composto majoritariamente por betaglucanas de baixo peso molecular, a qual solubilizou ou foi rapidamente degradada no rúmen. Tanto BG3 quanto BG4 passaram pelo mesmo processo de extração e purificação, o BG4 foi produzido por fermentação alcoólica. Diferenças no meio de cultivo podem promover a priorização de vias metabólicas associadas à biossíntese da betaglucana no *S. cerevisiae* (SHAHINIAN e BUSSEY, 2000), interferindo tanto na

quantidade de betaglucana, como também na sua massa molecular e grau de ramificação (NARUEMON *et al.*, 2013). Especificamente a fermentação alcoólica pode induzir a produção de betaclucanas com maior grau de ramificação da cadeia polimérica e, portanto, com paredes celulares mais rígidas e grossas (BASTOS *et al.*, 2015). Tal condição pode ajudar a explicar a maior estabilidade da betaglucana associada ao BG4. Por outro lado, a diferença de estabilidade ruminal observada entre as betaglucanas dos produtos BG1, BG2 e BG3, pode ser atribuída principalmente às diferenças de processo de extração, que pode sabidamente produzir extratos de betagluca com características de peso molecular, conformação e grau de ramificação distintos, mesmo que a fonte de betaglucana seja comum a todos (MAHESHWARI *et al.*, 2017; CASEIRO *et al.*, 2022).

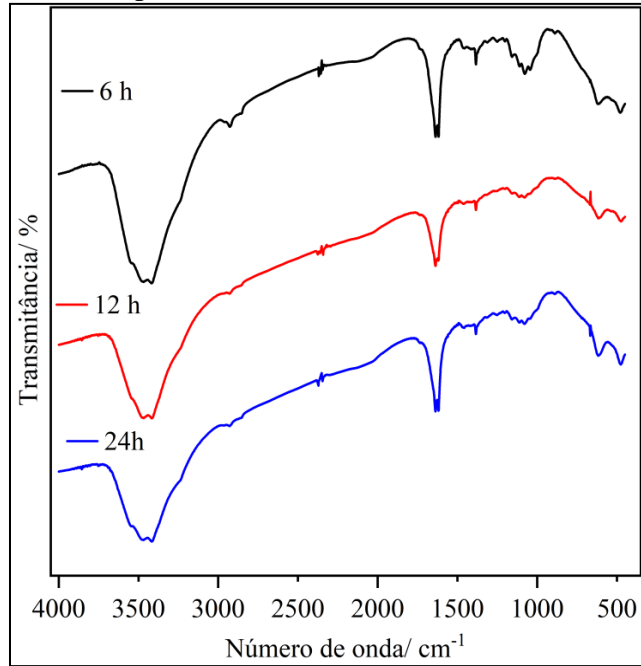
As Figuras 11, 12 e 13, mostram os espectros das amostras BG4, BG3 e BG2, respectivamente, após serem submetidas ao ambiente ruminal bovino por diferentes tempos. Em relação a amostras BG1 não foi possível obter os espectros uma vez que após 6 h no sistema ruminal essa já havia se degradado totalmente. Nos espectros de todas as amostras em todos os tempos analisados observa-se as bandas em torno de  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $1631/1818\text{ cm}^{-1}$  associadas à umidade das amostras e atribuídas ao  $\nu(\text{OH})$  e  $\delta(\text{OH})$ , respectivamente. A partir da análise do espectro do BG4 é possível observar a ausência quase total das bandas em  $2926/850$  e  $890\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  e ligação  $\beta$ , respectivamente. Além disso, uma diminuição significativa da intensidade das bandas nas regiões entre  $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ .

Figura 11 - Espectro de absorção no infravermelho do BG4 depois de submetido ao sistema ruminal por diferentes períodos.



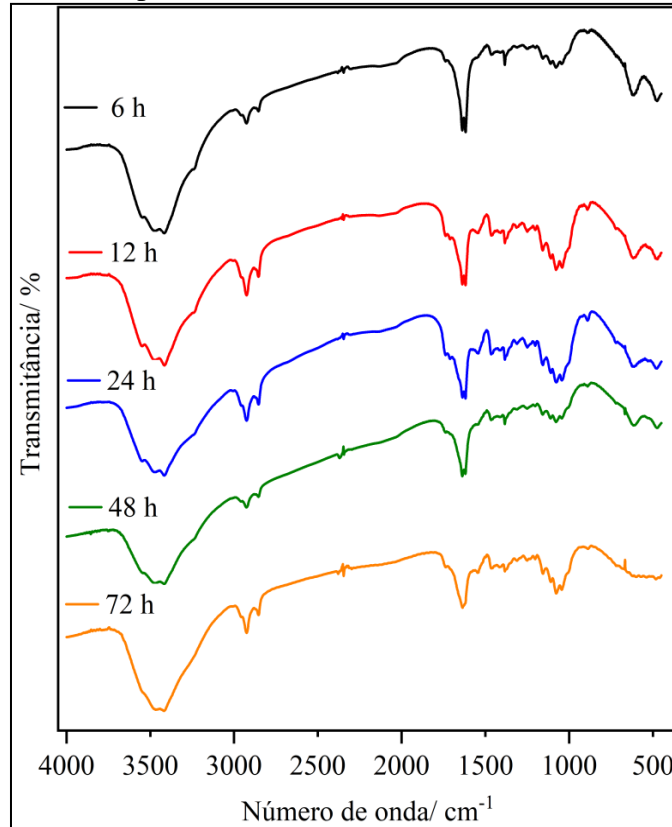
Fonte: Do autor (2022).

Figura 12 - Espectro de absorção no infravermelho do BG3 depois de submetido ao sistema ruminal por diferentes períodos.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 13 - Espectro de absorção no infravermelho do BG2 depois de submetido ao sistema ruminal por diferentes períodos.



Fonte: Do autor (2022).

Em relação ao espectro do BG3 em 6 h, ainda é possível notar as bandas em 2926/850 e 890  $\text{cm}^{-1}$  de forma mais nítida que do no espectro do BG4, no entanto no decorrer do tempo essas se tornam menos intensas assim como no BG4. O mesmo pode ser visualizado nas bandas nas regiões entre 1500-1300  $\text{cm}^{-1}$  e 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ .

Em relação aos espectros do BG2 observa-se que mesmo após 72 horas as bandas em 2926/850 e 890  $\text{cm}^{-1}$  apresentam-se de forma significativa nos espectros, da mesma forma que as bandas nas regiões em 1500 -1300  $\text{cm}^{-1}$  e 1200 – 900  $\text{cm}^{-1}$ , que têm apenas as suas intensidades relativas alteradas. Contudo, observa-se a formação de uma nova banda em 1730  $\text{cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída ao  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , devido à formação da ligação  $\text{C}=\text{O}$  no grupo final da molécula de  $\beta$ -glucana, após a cisão da ligação  $\beta$  (LUAN *et al.*, 2021). A formação dessa banda também é observada de forma menos intensa nos espectros do BG3. Por fim, a partir dos espectros pode-se indicar que a amostra BG2 apresenta maior estabilidade ao ambiente ruminal que as amostras BG3 e BG4, o que está de acordo com o ensaio de degradação ruminal.

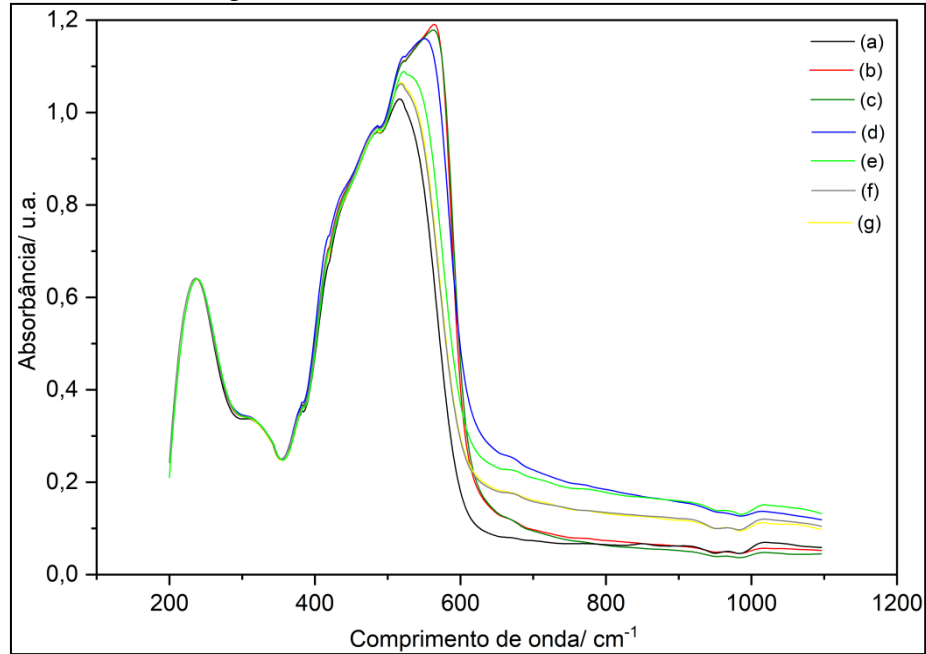


### 6.2.2. Espectroscopia UV-vis

Na literatura o vermelho congo é usado para caracterização de estruturas terciárias de glucanas, isso devido à sua interação com a tripla hélice  $\beta(1,3)$  e  $\beta(1,6)$  das glucanas que faz que ocorra um deslocamento do espectro Uv-vis para maiores comprimentos de onda (NITSCHKE *et al.*, 2011; SEMEDO *et al.*, 2015). Além disso, é descrito que o vermelho do congo não interage com outros polissacarídeos. Nos dois trabalhos glucanas extraídas de cogumelos foram solubilizadas em pH 7,0 utilizando soluções tampão, solução tampão fosfato (NITSCHKE *et al.*, 2011) e solução tampão ácido cítrico/hidróxido de sódio (SEMEDO *et al.*, 2015). Neste contexto, com o objetivo de comparar o deslocamento no espectro Uv-vis das diferentes amostras realizou-se o experimento de forma semelhante, modificando-se apenas a forma de solubilização das amostras, uma vez que as amostras não são solúveis utilizando-se os tampões descritos anteriormente.

A Figura 14 mostra o espectro Uv-vis das diferentes amostras analisadas e nele é possível observar que diferentemente do que foi descrito na literatura os carboidratos celulose e quitina foram o que interagiram mais com o corante vermelho do congo e assim apresentaram maior deslocamento no espectro Uv-vis. Isto pode estar relacionado com a forma diferente utilizada para solubilizar os materiais. Percebe-se que o ensaio em questão não é específico para glucanas, contudo levando em conta que o corante interage com polissacarídeos em geral, a partir do resultado obtido podem-se inferir quais amostras apresentam maior pureza através do maior deslocamento do espectro Uv-vis. Assim, o BG4 apresenta maior pureza, seguido do BG3. O BG1 e BG2 são os menos puros, com pureza semelhante. Este resultado está de acordo com o observado utilizando a deconvolução do espectro no infravermelho que indicou o BG3 e BG4 como mais puros.

Figura 14 - Espectro Uv-vis do vermelho do congo (a), quitina (b), celulose (c), BG4 (d), BG3 (e), BG2 (f) e BG1 (g).



Fonte: Do autor (2022).

## 7. CONCLUSÕES PARCIAIS

Baseado em nossos resultados parciais, por mais que, quimicamente, os quatro produtos sejam betaglucana, por serem produzidos a partir de uma mesma estirpe de levedura, porém com variações nos processos de cultivo, extração e purificação, podem apresentar comportamento de degradação ruminal distintos, o que pode impactar na sua biodisponibilidade. Como consequência disso, baseado no comportamento imunofarmacológico da BG, sugere-se que para o uso deste biopolímero em bovinos para determinada aplicação biológica, sejam necessários estudos específicos do comportamento ruminal da BG escolhida para que sejam definidos protocolos de uso e dose da mesma. Com isso, dificilmente, será possível comparar doses para ruminantes obtidas de diferentes fontes de BG ou diferentes processos de produção e extração da mesma.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDELAZIZ, R. M.; EL-MAGHRABY, A.; SADIK, W. A.-A.; EL-DEMERDASH, A.G. M. *et al.* Biodegradable cellulose nanocrystals hydrogels for removal of acid red 8 dye from aqueous solutions. **Scientific Reports**, 12, n. 1, p. 6424, 2022/04/19 2022. Doi: 10.1038/s41598-022-10087-1.

ADAMS, E.L.; RICE, P.J.; GRAVES, B. *et al.* Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2008; 325(1):115–123. Doi: 10.1124/jpet.107.133124.

AHMAD, ASIF; KALEEM, MUHAMMAD.  $\beta$ -Glucan as a Food Ingredient. In: **Biopolymers for food design**. Academic Press, 2018. p. 351-381. Doi: 10.1016/B978-0-12-811449-0.00011-6.

AKRAMIENĖ, D., KONDROTAS, A., DIDŽIAPETRIENĖ, J., & KĖVELAITIS, E. (2007). Effects of  $\beta$ -glucans on the immune system. **Medicina**, 43(8), 597. Doi: 10.3390/medicina43080076.

ALMEIDA, M. R.; ALVES, R. S.; NASCIMBEM, L. B.; STEPHANI, R.; POPPI, R. J. & DE OLIVEIRA, L. F. C. (2010). Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 397(7), 2693-2701. Doi: 10.1007/s00216-010-3566-2.

ALUGONGO, G. M.; XIAO, J.; WU, Z.; LI, S.; WANG, Y. & CAO, Z. (2017). Utilization of yeast of *Saccharomyces cerevisiae* origin in artificially raised calves. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 8(1), 1-12. Doi: 10.1186/s40104-017-0165-5.

ALVES, A. P. P.; DE OLIVEIRA, L. P.; CASTRO, A. A.; NEUMANN, R.; DE OLIVEIRA, L. F.; EDWARDS, H. G. & SANT'ANA, A. C. (2016). The structure of different cellulosic fibres characterized by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 324-330, 2016. Doi: 10.1016/j.vibspec.2016.08.007.

AVRAMIA, IONUT; AMARIEI, SONIA. Spent brewer's yeast as a source of insoluble  $\beta$ -glucans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 825, 2021. Doi: 10.3390/ijms22020825.

BADHAN A.; LOW K. E.; JONES D. R.; XING X.; RAZA M.; MILANI M. *et al.* (2022). Mechanistic insights into the digestion of complex dietary fibre by the rumen microbiota using combinatorial high-resolution glycomics and transcriptomic analyses. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. 20 148–164. Doi: 10.1016/j.csbj.2021.12.009.

BASTOS, RITA; COELHO, ELISABETE; COIMBRA, MANUEL A. Modifications of *Saccharomyces pastorianus* cell wall polysaccharides with brewing process. **Carbohydrate polymers**, v. 124, p. 322-330, 2015. Doi: 10.1016/j.carbpol.2015.02.031.

BELZECKI, G.; MILTKO, R. & MICHALOWSKI, T. (2012). Ability of rumen protozoa *Diploplastron* affine to utilize  $\beta$ -glucans. **Folia microbiologica**, 57(4), 259-262. Doi: 10.1007/s12223-012-0120-y.

BOUTROS, JEAN A.; MAGEE, ANDREW S.; COX, Donald. Comparison of structural differences between yeast  $\beta$ -glucan sourced from different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processed using proprietary manufacturing processes. **Food Chemistry**, v. 367, p. 130708, 2022. Doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130708.

BROWN, GORDON D.; GORDON, SIAMON. Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, n. 3, p. 311-315, 2003. Doi: 10.1016/S1074-7613(03)00233-4.

BZDUCHA-WRÓBEL, A.; KOCZOŃ, P.; BŁAŻEJAK, S.; KOZERA, J. *et al.* Valorization of Deproteinized Potato Juice Water into  $\beta$ -Glucan Preparation of *C. utilis* Origin: Comparative Study of Preparations Obtained by Two Isolation Methods. **Waste and Biomass Valorization**, 11, n. 7, p. 3257-3271. Doi: 10.1007/s12649-019-00641-w.

CABIB, E.; ROH, D.H.; SCHMIDT, M.; CROTTI, L.B.; AND VARMA, A. (2001) The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. **Journal of Cell Biology** 276: 19679–19682. Doi: 10.1074/jbc.R000031200.

CANGEMI, J. M.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O. & SANTOS, A. M. D. (2006). Study of the biodegradation of a polymer derived from castor oil by scanning electron microscopy, thermogravimetry and infrared spectroscopy. **Polímeros**, 16, 129-135 Doi: 10.1590/S0104-14282006000200013.

CÁRDENAS, G.; CABRERA, G.; TABOADA, E.; MIRANDA, S. P. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and  $^{13}\text{C}$  cross polarization/mass angle spinning NMR. **Journal of Applied Polymer Science**, 93, n. 4, p. 1876-1885. Doi: 10.1002/app.20647.

CASEIRO, C.; DIAS, J. N. R.; DE ANDRADE FONTES, C. M. G. & BULE, P. (2022). From Cancer Therapy to Winemaking: The Molecular Structure and Applications of  $\beta$ -Glucans and  $\beta$ -1, 3-Glucanases. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(6), 3156. Doi: 10.3390/ijms23063156.

CHAIYASUT, C.; PENGKUMSRI, N.; SIVAMARUTHI, B.; SIRILUN, S. *et al.* Extraction of  $\beta$ -glucan of *Hericium erinaceus*, *Avena sativa* L., and *Saccharomyces cerevisiae* and in vivo evaluation of their immunomodulatory effects. **Food Science and Technology**, 38. Doi: 10.1590/fst.18217.

CHEN, A.; PAN, F.; ZHANG, T.; YU, C. *et al.* Characterization of chitin-glucan complex from *Tremella fuciformis* fermentation residue and evaluation of its antibacterial performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, 186, p. 649-655. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.048.

CHING, JOOJIE *et al.* Immunomodulatory activity of  $\beta$ -glucans in fish: Relationship between  $\beta$ -glucan administration parameters and immune response induced. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 5, p. 1824-1845, 2021. Doi: 10.1111/are.15086.

CHOLEWIŃSKA P.; CZYŻ K.; NOWAKOWSKI P.; WYROSTEK A. (2020). The microbiome of the digestive system of ruminants – a review. **Animal Health Research Reviews** 21, 3–14. Doi: 10.1017/S1466252319000069.

DE GRAAFF, P.; GOVERS, C.; WICHERS, H. J. & DEBETS, R. (2018). Consumption of  $\beta$ -glucans to spice up T cell treatment of tumors: a review. **Expert opinion on biological therapy**, 18(10), 1023-1040. DOI: 10.1080/14712598.2018.1523392.

DENNEHY K.M.; FERWERDA G.; FARO-TRINDADE I.; PYZ E.; WILLMENT J.A.; TAYLOR P.R.; KERRIGAN A.; TSONI S.V.; GORDON S.; MEYER-WENTRUP F.; ADEMA G.J.; KULLBERG B.J.; SCHWEIGHOFFER E.; TYBULEWICZ V.; MORA-MONTES H.M.; GOW N.A.; WILLIAMS D.L.; NETEA M.G.; BROWN G.D. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. **European journal of immunology**. 38;500-506, 2008. Doi: 10.1002/eji.200737741.

DI LUZIO, N. R.; WILLIAMS, D. L. Protective effect of glucan against systemic *Staphylococcus aureus* septicemia in normal and leukemic mice. **Infection and Immunity**, v. 20, n. 3, p. 804-810, 1978. Doi: 10.1128/iai.20.3.804-810.1978.

DILLON, S.; AGRAWAL, S.; BANERJEE, K.; LETTERIO, J.; DENNING, T. L.; OSWALD-RICHTER, K.; PULENDRAN, B. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. **The Journal of clinical investigation**, 116(4), 916-928. Doi: 10.1172/JCI27203.

DU, L.; ZHANG, X.; WANG, C. & XIAO, D. (2012). Preparation of water soluble yeast glucan by four kinds of solubilizing processes. **Engineering**, 4(10B), 184-88.

EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; WEBSTER, D. FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 53, n. 13, p. 2383-2392, 1997. Doi: 10.1016/S1386-1425(97)00178-9.

FERREIRA, GERCIAPRIJO. "Análise comparativa de glicanas e quitinas da parede celular de espécies de *Trichoderma* e a relação desses polissacarídeos no pareamento com fitopatógenos." (2018). Acesso em: <https://www.btdt.ueg.br/handle/tede/747>.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -Dglucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 54, n. 2, p. 159-171, 2003. Doi: 10.1016/S0144-8617(03)00162-0.

GADDE, U.; KIM, W.H.; OH, S.T. AND H.S. LILLEHOJ (2017) Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. **Animal health research reviews**. 18:26-45. Doi:10.1017/S1466252316000207.

GALICHET, A.; SOCKALINGUM, G. D.; BELARBI, A.; MANFAIT, M. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **FEMS Microbiol Lett**, 197, n. 2, p. 179-186, 2001/04/21. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10601.x.

GAO, D. Y.; SUN, X. B.; FANG, Y.; HE, B.; WANG, J. H.; LIU, J. X. & WANG, Q. (2022). Heterologous expression and characterization of two novel glucanases derived from sheep rumen microbiota. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 38(5), 1-14. Doi: 10.1007/s11274-022-03269-6.

GHASSEMI, N.; POULHAZAN, A.; DELIGEY, F.; MENTINK-VIGIER, F.; MARCOTTE, I. & WANG, T. (2021). Solid-state NMR investigations of extracellular matrixes and cell walls of algae, bacteria, fungi, and plants. **Chemical Reviews**, 122(10), 10036-10086. Doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00669.

GIEROBA, B.; SROKA-BARTNICKA, A.; KAZIMIERCZAK, P.; KALISZ, G. *et al.* Surface Chemical and Morphological Analysis of Chitosan/1,3- $\beta$ -D-Glucan Polysaccharide Films Cross-Linked at 90 °C. **International Journal of Molecular Sciences**, 23, n. 11, 2022/06/11. Doi: 10.3390/ijms23115953.

GIEROBA, B.; SROKA-BARTNICKA, A.; KAZIMIERCZAK, P.; KALISZ, G. *et al.* Effect of Gelation Temperature on the Molecular Structure and Physicochemical Properties of the Curd Matrix: Spectroscopic and Microscopic Analyses. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, n. 17, 2020/08/30. Doi: 10.3390/ijms21176154.

GIMENES, G.; DÍAS, E.; DÍAS, B.; GERBAS, A.; ALMADA, A.; BORGES, J. & JÚNIOR, P. (2020). Eficácia da suplementação oral com 1,3-1,6 betaglucano proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 72(4), 1441-1448. Doi: 10.1590/1678-4162-10556.

GROVE, A. V.; KAISER, C. R.; IVERSEN, N.; HAFLA, A.; ROBINSON, B. L. & BOWMAN, J. G. P. (2006, June). Digestibility of barley beta-glucan in cattle. In **Western Section American Society of Animal Science** (Vol. 57, pp. 367-396).

HAN, B.; BARUAH, K.; COX, E.; VANROMPAY, D. & BOSSIER, P. (2020). Structure-functional activity relationship of  $\beta$ -glucans from the perspective of immunomodulation: a mini-review. **Frontiers in Immunology**, 11, 658. Doi: 10.3389/fimmu.2020.00658.

HANDEL, ANDREAS; MARGOLIS, ELISA; LEVIN, BRUCE R. Exploring the role of the immune response in preventing antibiotic resistance. **Journal of theoretical biology**, v. 256, n. 4, p. 655-662, 2009. Doi: 10.1016/j.jtbi.2008.10.025.

HINO, S.; NISHIMURA, N.; MATSUDA, T.; MORITA, T. Intestinal Absorption of  $\beta$ -Glucans and Their Effect on the Immune System. **Preprints** 2020, 2020120250. Doi: 10.20944/preprints202012.0250.v1.

HOLTEKJØLEN, A. K.; VHILE, S. G.; SAHLSTRØM, S.; KNUTSEN, S. H.; UHLEN, A. K.; ÅSSVEEN, M. & KJOS, N. P. (2014). Changes in relative molecular weight distribution of soluble barley beta-glucan during passage through the small intestine of pigs. **Livestock Science**, 168, 102-108). Doi: 10.1016/j.livsci.2014.06.027.

HONG F.; YAN J.; BARAN J.T. *et al.* Mechanism by which orally administered  $\beta$ -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. **The Journal of Immunology**. 2004;173(2):797–806. Doi: 10.4049/jimmunol.173.2.797.

JIMENEZ-LUCHO, VICTOR; GINSBURG, V.; KRIVAN, H. C. Cryptococcus neoformans, Candida albicans, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal beta 1-4Glc beta 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts.

**Infection and immunity**, v. 58, n. 7, p. 2085-2090, 1990. Doi: 10.1128/iai.58.7.2085-2090.1990.

KATSNELSON, ALLA. Building a Healthy Herd without Antibiotics. **ACS Central Science**, v. 6, n. 1, p. 8, 2020. Doi: 10.1021/acscentsci.0c00009.

KAUR, R.; SHARMA, M.; JI, D.; XU, M.; AGYEI, D., 2020. Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. **Fibers** 8, 1. Doi: 10.3390/fib8010001.

KALYANI, D. C.; REICHENBACH, T.; ASPEBORG, H. & DIVNE, C. (2021). A homodimeric bacterial exo- $\beta$ -1, 3-glucanase derived from moose rumen microbiome shows a structural framework similar to yeast exo- $\beta$ -1, 3-glucanases. **Enzyme and microbial technology**, 143, 109723. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109723.

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; TUN, H. M.; DERAKHSHANI, H.; MOOSSAVI, S. & PLAIZIER, J. C. (2016). Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. **Animal Frontiers**, 6(2), 13-19. Doi: 10.2527/af.2016-0018.

KHATIBI, S.; OSTADHASSAN, M.; TUSCHEL, D.; GENTZIS, T. & CARVAJAL-ORTIZ, H. (2018). Evaluating molecular evolution of kerogen by raman spectroscopy: correlation with optical microscopy and rock-eval pyrolysis. **Energies**, 11(6), 1406. Doi: 10.3390/en11061406.

KIM, H. S.; HONG, J. T.; KIM, Y. & HAN, S. B. (2011). Stimulatory effect of  $\beta$ -glucans on immune cells. **Immune network**, 11(4), 191-195. Doi: 10.4110/in.2011.11.4.191.

KOVALEVA, E.; PESTOV, A.; STEPANOVA, D.; MOLOCHNIKOV, L. (2016) Characterization of chitin and its complexes extracted from natural raw sources. **AIP Conference Proceedings**, 1772, n. 1, p. 050007. Doi: 10.1063/1.4964577.

LAHNBORG, G.; HEDSTRÖM, K.-G.; NORD, C.-E. Glucan-induced enhancement of host resistance in experimental intraabdominal sepsis. **European Surgical Research**, v. 14, n. 6, p. 401-408, 1982. Doi: 10.1159/000128314.

LARSSON, D. G.; FLACH, CARL-FREDRIK. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 257-269, 2022. Doi: 10.1038/s41579-021-00649-x.

LEBRON, F.; VASSALLO, R.; PURI, V. & LIMPER, A. H. (2003). Pneumocystis carinii cell wall  $\beta$ -glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF- $\kappa$ B activation. **Journal of Biological Chemistry**, 278(27), 25001-25008. Doi: 10.1074/jbc.M301426200.

LEE, C.; VERMA, R.; BYUN, S.; JEUN, E.-J.; KIM, G.-C.; LEE, S.; KANG, H.-J.; KIM, C.J.; SHARMA, G.; LAHIRI, A.; *et al.* Structural specificities of cell surface  $\beta$ -glucan polysaccharides determine commensal yeast mediated immuno-modulatory activities. **Nature communications**. 2021, 12, 1–16. Doi: 10.1038/s41467-021-23929-9.

LEE, CHEOL MIN *et al.* Raman spectroscopy and density functional theory calculations of  $\beta$ -glucans and chitins in fungal cell walls. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 3, p. 943-945, 2013. Doi:10.5012/bkcs.2013.34.3.943.

LEE, D. Y.; JI, I. H.; CHANG, H. I. & KIM, C. W. (2002). High-level TNF- $\alpha$  secretion and macrophage activity with soluble  $\beta$ -glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 66(2), 233-238. Doi: 10.1271/bbb.66.233.

LEHTOVAARA, BENJAMIN C.; GU, FRANK X. Pharmacological, structural, and drug delivery properties and applications of 1, 3- $\beta$ -glucans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6813-6828, 2011. Doi: 10.1021/jf200964u.

LEIBUNDGUT-LANDMANN S.; GROSS O.; ROBINSON M.J.; OSORIO F.; SLACK E.C. *et al.* 2007. Syk- and CARD9- dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nature immunology**. 8:630–38. Doi: 10.1038/ni1460.

LIU, Y.; KIM, H. J. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Simple Algorithm Analysis for Rapid and Non-Destructive Assessment of Developmental Cotton Fibers. **Sensors (Basel)**, 17, n. 7, 2017/06/24. Doi: 10.3390/s17071469.

LOWRY, V. K.; FARNELL, M. B.; FERRO, P. J.; SWAGGERTY, C. L.; BAHL, A. R. U. N. & KOGUT, M. H. (2005). Purified  $\beta$ -glucan as an abiotic feed additive up-regulates the innate immune response in immature chickens against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. **International journal of food microbiology**, 98(3), 309-318. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.008.

LUAN, L. Q.; VU, N. T.; NGHIA, N. T.; THAO, N. H. P. Synergic degradation of yeast  $\beta$ -glucan with a potential of immunostimulant and growth promotor for tiger shrimp. **Aquaculture Reports**, 21, p. 100858. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235251342100274X>.

LUZ JR, L. F. D. L.; KAMINSKI, M.; KOZAK, R. H. & NDIAYE, P. M. (2009). Bioetanol, biodiesel e biocombustíveis: perspectivas para o futuro.

MAGNANI, Marciane; CASTRO-GÓMEZ, Raul Jorge Hernan. Beta-glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: Constitution, bioactivity and obtaining. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MANABE, N. & YAMAGUCHI, Y. (2021). 3D Structural Insights into  $\beta$ -Glucans and Their Binding Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(4), 1578. Doi: 10.3390/ijms22041578.

MANNERS, David J.; MASSON, Alan J.; PATTERSON, James C. The structure of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from yeast cell walls. **Biochemical Journal**, v. 135, n. 1, p. 19-30, 1973. Doi: 10.1042/bj1350019.

MAHESHWARI, G.; SOWRIRAJAN, S. & JOSEPH, B. (2017). Extraction and Isolation of  $\beta$ -Glucan from Grain Sources - A Review. **Journal of Food Science**, 82(7), 1535-1545. Doi: 10.1111/1750-3841.13765.

MILHOMENS, G. C.; DE ALMEIDA, C. G.; DE SOUSA SALOMÃO ZANETTE, R.; DE SOUZA, N. L. G. D. *et al.* (2018). Biocompatibility and adsorption properties of



hydrogels obtained by graft polymerization of acrylic acid on cellulose from rice hulls. **Iranian Polymer Journal**, 27, n. 12, p. 1023-1032. Doi: 10.1007/s13726-018-0672-z.

M. MUNK, H.M.; BRANDÃO, S.; NOWAK, L.; MOUTON, J.C.; GERN, A.S.; GUIMARAES, C.; YÉPRÉMIAN, A.; COUTÉ, N.R.B.; RAPOSO, J.M.; MARCONCINI. Direct and indirect toxic effects of cotton-derived cellulose nanofibres on filamentous green algae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 122 (2015), pp. 399-405. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.001>.

MURPHY, D.; RICCI, A.; AUCE, Z.; BEECHINOR, J. G.; BERGENDAHL, H.; BREATHNACH, R. *et al.* (2017). EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). **EFSA J.** 15: e04666. Doi: 10.2903/j.efsa.2017.4666.

NARUEMON, M.; ROMANEE, S.; CHEUNJIT, P.; XIAO, H.; MCLANDSBOROUGH, L. A. & PAWADEE, M. (2013). Influence of additives on *Saccharomyces cerevisiae* [Beta]-glucan production. **International Food Research Journal**, 20(4), 1953.

NITSCHKE, J.; MODICK, H.; BUSCH, E.; VON REKOWSKI, R. W. *et al.* A new colorimetric method to quantify  $\beta$ -1,3-1,6-glucans in comparison with total  $\beta$ -1,3-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, 127, n. 2, p. 791-796. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611000628>.

NOVÁK, M.; SYNITSYA, A.; GEDEON, O.; SLEPIČKA, P. *et al.* Yeast  $\beta$  (1-3),(1-6)-d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, 87, n. 4, p. 2496-2504. Doi: 10.1016/j.carbpol.2011.11.031.

NOVAK, M.; VETVICKA, V.  $\beta$ -glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. **Journal of immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47-57, 2008. Doi: 10.1080/15476910802019045.

OGAWA K.; NISHIKORI J.; INO T.; MATSUDA K. Chemical Structures of Oligosaccharides Obtained from Partial Acid Hydrolysates of *Saccharomyces cerevisiae* Mannan. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 1994; 58 (3): 560–562. Doi: 10.1271/bbb.58.560.

OH, S. Y.; YOO, D. I.; SHIN, Y.; SEO, G. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. **Carbohydrate Research**, 340, n. 3, p. 417-428. Doi: 10.1016/j.carres.2004.11.027.

OMARA, I.I.; PENDER, C.M.; WHITE, M.B.; DALLOUL, R.A. The Modulating Effect of Dietary Beta-Glucan Supplementation on Expression of Immune Response Genes of Broilers during a Coccidiosis Challenge. **Animals** 2021, 11, 159. Doi: 10.3390/ani11010159.

ONDERDONK, A. B.; CISNEROS, R. L.; HINKSON, P. & OSTROFF, G. (1992). Anti-infective effect of poly-beta 1-6-glucotriosyl-beta 1-3-glucopyranose glucan in vivo. **Infection and immunity**, 60(4), 1642-1647. DOI: 10.1128/iai.60.4.1642-1647.1992.

PAGLIUSO, D.; GRANDIS, A.; DE SOUSA, C. R.; DE SOUZA, A. P. *et al.* The Effect of Sugarcane Straw Aging in the Field on Cell Wall Composition. **Frontiers in plant science**, 12, p. 652168, 2021/08/03. Doi: 10.3389/fpls.2021.652168.

PALMA A.S.; FEIZI T.; ZHANG Y.; STOLL M.S.; LAWSON A.M.; DÍAZ-RODRÍGUEZ E.; CAMPANERO-RHODES M.A.; COSTA J.; GORDON S.; BROWN G.D.; CHAI W. Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using “designer” microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, 281;5771-5779, 2006). Doi: 10.1074/jbc.M511461200.

PARAPOULI, M., VASILEIADIS, A., AFENDRA, A. S., & HATZILOUKAS, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS microbiology**, 6(1), 1. Doi: 10.3934/microbiol.2020001.

PARISH, J.A.; J.D. RIVERA, & H.T. BOLAND. 2009. “Understanding the ruminant animal digestive system”, [Online], Mississippi State University Extension Service, Starkville, MSc. Disponível em: <http://msucares.com/pubs/publications/p2503.pdf>.

PATIDAR, A.; MAHANTY, T.; RAYBARMAN, C.; SARODE, A. Y.; BASAK, S.; SAHA, B. & BHATTACHARJEE, S. (2020). Barley beta-Glucan and Zymosan induce Dectin-1 and Toll-like receptor 2 co-localization and anti-leishmanial immune response in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, 92(6), e12952. Doi: <https://doi.org/10.1111/sji.12952>.

PEAT S.; WHELAN W.J.; EDWARDS T.E.; Polysaccharides of baker’s yeast. Part IV. Mannan. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**. 1961; 29–34.

PEDRO A.R.V.; LIMA T.; FRÓIS-MARTINS R.; LEAL B.; RAMOS I.C.; MARTINS E.G.; CABRITA A.R.J.; FONSECA A.J.M.; MAIA M.R.G.; VILANOVA M. AND CORREIA A. (2021) Dectin-1-Mediated Production of Pro-Inflammatory Cytokines Induced by Yeast  $\beta$ -Glucans in Bovine Monocytes. **Frontiers in immunology**. 12:689879. Doi: 10.3389/fimmu.2021.689879.

PENKUMSRI, N.; SIVAMARUTHI, B.; SIRILUN, S.; PEERAJAN, S. *et al.* Extraction of  $\beta$ -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in Vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. **Food Science and Technology (Campinas)**, 37. Doi: <https://doi.org/10.1590/1678-457X.10716>.

PIZARRO, R. S.  $\beta$ -glucans: what types exist and what are their health benefits? **Chilean Nutrition Magazine**, v. 41, p. 439-445, 2014. Doi:10.1155/2012/851362.

PODPORA B.; ŚWIDERSKI F.; SADOWSKA A.; RAKOWSKA R.; WASIAK-ZYS G. Spent brewer’s yeast extracts as a new component of functional food. Czech. **Journal of Food Science**, 2016; 34: 554–563. Doi: 10.17221/419/2015-CJFS.

PORNANEK, PITUKPOL; PHOEMCHALARD, CHIRASAK. Dietary supplementation of beta-glucan-rich molasses yeast powder on antibody response to swine fever virus and hematology of starter–grower pigs. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 1, p. 1-6, 2021.

PULINGAM, T.; PARUMASIVAM, T.; GAZZALI, A.M.; SULAIMAN, A.M.; CHEE, J.Y.; LAKSHMANAN, M.; CHIN, C.F.; SUDESH, K., 2021. Antimicrobial resistance: prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 106103. Doi: 10.1016/j.ejps.2021.106103.

RICE, P. J.; ADAMS, E. L.; OZMENT-SKELTON, T.; GONZALEZ, A. J.; GOLDMAN, M. P.; LOCKHART, B. E. & WILLIAMS, D. L. (2005). Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 314(3), 1079-1086. Doi: 10.1124/jpet.105.085415.

SAGNELLI, D.; KIRKENSGAARD, J. J.; GIOSAFATTO, C. V. L.; OGRODOWICZ, N.; KRUCZAŁA, M.S.; MIKKELSEN, J.E.; MAIGRET, D.; LOURDIN, K.; MORTENSEN, A.; BLENNOW. All-natural bio-plastics using starch-beta-glucan composites. **Carbohydrate Polymers**. 72 (2017), pp. 237-245. Doi: 10.1016/j.carbpol.2017.05.043.

SCHEPETKIN, IGOR A.; QUINN, MARK T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006. Doi: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.

SCHWARTZ, B.; VETVICKA, V. Review:  $\beta$ -glucans as Effective Antibiotic Alternatives in Poultry. **Molecules** 2021, 26, 3560. Doi: 10.3390/molecules26123560).

SECHI, N. S. M. Fosforilação da (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana (lasiodiplodana): caracterização físico-química e estrutural. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017. Acesso em: <http://riut.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2275>.

SEMEDO, M. C.; KARMALI, A.; FONSECA, L. A high throughput colorimetric assay of  $\beta$ -1,3-d-glucans by Congo red dye. **Journal of Microbiological Methods**, 109, p. 140-148, 2015/02/01/ 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.020>.

SHAHINIAN, S. & BUSSEY, H. (2000).  $\beta$ -1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular microbiology**, 35(3), 477-489.

SIETSMA, J. H.; WESSELS, J. G. H. Evidence for Covalent Linkages between Chitin and  $\beta$ -Glucan in a Fungal Wall. **Microbiology**, 114, n. 1, p. 99-108. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-99>. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01713.x.

SONCK, E.; STUYVEN, E.; GODDEERIS, B. & COX, E. (2010). The effect of  $\beta$ -glucans on porcine leukocytes. **Veterinary immunology and immunopathology**, 135(3-4), 199-207. Doi: 10.1016/j.vetimm.2009.11.014.

SOUZA, NELSON LUIS G.D.; BRANDÃO, HUMBERTO M.; DE OLIVEIRA, LUIZ FERNANDO C. Spectroscopic and thermogravimetric study of chitosan after incubation in bovine rumen. **Journal of Molecular Structure**, v. 1005, n. 1-3, p. 186-191, 2011. Doi: 10.1016/j.molstruc.2011.08.049.

STUYVEN, E.; COX, E.; VANCAENEGHEM, S.; ARNOUITS, S.; DEPREZ, P. & GODDEERIS, B. M. (2009). Effect of  $\beta$ -glucans on an ETEC infection in piglets. **Veterinary immunology and immunopathology**, 128(1-3), 60-66. Doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.311.

SUN, X.; GAO, Y.; DING, Z.; ZHAO, Y.; YANG, Y.; SUN, Q.; YANG, X.; GE, W.; XU, X.; CHENG, R. Soluble Beta-Glucan Salecan Improves Vaginal Infection of *Candida Albicans* in Mice. **International journal of biological macromolecules**. 2020, 148, 1053–1060. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.220.

SUZUKI, I.; TANAKA, H.; KINOSHITA, A.; OIKAWA, S.; OSAWA, M. & YADOMAE, T. (1990). Effect of orally administered  $\beta$ -glucan on macrophage function in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, 12(6), 675-684. Doi: 10.1016/0192-0561(90)90105-V.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, 2, n. 2, p. 17, 2014/10/22. Doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07.

TZIANABOS, ARTHUR O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000. Doi: 10.1128/CMR.13.4.523.

UCHIYAMA, H.; IWAI, A.; ASADA, Y.; MURAMATSU, D.; AOKI, S.; KAWATA, K.; KUSANO, K.; NAGASHIMA, K.; YASOKAWA, D.; OKABE, M.; *et al.* A Small Scale Study on the Effects of Oral Administration of the  $\beta$ -Glucan Produced by *Aureobasidium pullulans* on Milk Quality and Cytokine Expressions of Holstein Cows, and on Bacterial Flora in the Intestines of Japanese Black Calves. **BMC Research Notes** 2012, 5, 189. Doi: 10.1186/1756-0500-5-189.

VACLAV, V.; MIROSLAV, N. Biology and Chemistry of Beta Glucan: Beta-Glucan, Structure, Chemistry and Specific Application. Canada: **Bentham Science Publishers**, p. 1-258, 2013. Doi: 10.2174/97816080526081130201.

VARELAS, V.; LIOUNI, M.; CALOKERINOS, A. C.; & NERANTZIS, E. T. (2016). An evaluation study of different methods for the production of  $\beta$ -D-glucan from yeast biomass. **Drug testing and analysis**, 8(1), 46-55. Doi: 10.1002/dta.1833.

VETVICKA, V. & VETVICKOVA, J. (2008). A comparison of injected and orally administered  $\beta$ -glucans. **JANA**, 11(1), 42-49.

WAKSHULL E.; BRUNKE-REESE D.; LINDERMUTH J.; FISETTE L.; NATHANS R.S.; CROWLEY J.J.; TUFTS J.C.; ZIMMERMAN J.; MACKIN W.; ADAMS D.S. PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor. **Immunopharmacology**. 1999, 41 (2). Doi: 10.1016/S0162-3109(98)00059-9.

WANG, J.; GIGLIOTTI, F.; MAGGIRWAR, S.; JOHNSTON, C.; FINKELSTEIN, J. N. & WRIGHT, T. W. (2005). *Pneumocystis carinii* activates the NF- $\kappa$ B signaling pathway in

alveolar epithelial cells. **Infection and immunity**, 73(5), 2766-2777. Doi: 10.1128/IAI.73.5.2766-2777.2005.

WANG, Y.; ZHANG, L.; LI, Y.; HOU, X. & ZENG, F. (2004). Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a  $\beta$ -glucan from *Poria cocos sclerotium*. **Carbohydrate research**, 339(15), 2567-2574. Doi: 10.1016/j.carres.2004.08.003.

WANG, Q.; SHENG, X.; SHI, A.; HU, H.; YANG, Y.; LIU, L.; FEI, L.; LIU, H.  $\beta$ -Glucans: Relationships between modification, conformation and functional activities. **Molecules** 2017, 22, 257. Doi: 10.3390/molecules22020257.

WILLIAMS, A.; SUN, X.; FISCHER, J. E. & HASSELGREN, P. O. (1999). The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. **Surgery**, 126(4), 744-750. Doi: 10.1016/S0039-6060(99)70131-5.

WILLIAMS, DAVID L.; BROWDER, I. WILLIAM; DI LUZIO, NICHOLAS R. Immunotherapeutic modification of *Escherichia coli*-induced experimental peritonitis and bacteremia by glucan. **Surgery**, v. 93, n. 3, p. 448-454, 1983. Doi: 10.5555/uri:pii:0039606083902222.

WRIGHT, W. F.; OVERMAN, S. B. & RIBES, J. A. (2011). (1–3)- $\beta$ -D-glucan assay: a review of its laboratory and clinical application. **Laboratory Medicine**, 42(11), 679-685. Doi: 10.1309/lm8bw8qnv7nzbrog.

XIA, Y.; VĚTVIČKA, V.; YAN, J.; HANIKÝROVÁ, M.; MAYADAS, T. & ROSS, G. D. (1999). The  $\beta$ -glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. **The Journal of Immunology**, 162(4), 2281-2290. Doi: 10.4049/jimmunol.162.4.2281.

XING, B.; HAN, Y.; WANG, X.C.; WEN, J.; CAO, S.; ZHANG, K.; LI, Q.; YUAN, H. Persistent action of cow rumen microorganisms in enhancing biodegradation of wheat straw by rumen fermentation. **Science of the Total Environment**. 2020, 715, 136529. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136529.

ZHANG, L.; LI, X.; XU, X.; ZENG, F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate Research**, 340 (2005), pp. 1515-1521. Doi:10.1016/j.carres.2005.02.032.

ZONG, AIZHEN; CAO, HONGZHI; WANG, FENGSHAN. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395-1410, 2012. Doi: 10.1016/j.carbpol.2012.07.026.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans, **Food Hydrocolloids** (2015), doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.07.003.

**SEGUNDA PARTE****ARTIGO - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE RUMINAL DE DIFERENTES  
PRODUTOS DE BETAGLUCANA EXTRAÍDOS DE *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE* PARA SUBSIDIAR SEU USO COMO IMUNOFÁRMACO**

## EVALUATION OF THE RUMINAL STABILITY OF DIFFERENT BETAGLUCAN PRODUCTS EXTRACTED FROM SACCHAROMYCES CEREVISIAE TO SUBSIDY ITS USE AS AN IMMUNODRUG

**ABSTRACT:** We evaluated the ruminal stability of four betaglucan products extracted from the same strain of *S.cerevisiae*, with variations in the culture medium and in the extraction process. Samples were incubated in the rumen of fistulated cattle (*in situ*) for 72 hours. The analysis times were 6, 12, 24, 48 and 72 h. For these samples, mass loss and chemical modifications of the polymeric chain were evaluated by Raman spectroscopy, infrared and NMR techniques. The rate of mass loss varied in all beta-glucan extracts, probably after cleavage of the polymeric chain at the  $\beta$  (1,3) and  $\beta$  (1,6) bonds. With loss of molecular weight and intensity of polymer chain branching. The passage of betaglucan through the rumen promoted chemical modifications in different betaglucan extracts. Such a condition has the potential to impact both the bioavailability and the biological activity of orally administered beta-glucan for cattle.

Keywords: *antimicrobial resistance. biopolymer, chemical structure, immunomodulation, pathogens.*

### INTRODUCTION

It is estimated that by 2050 antimicrobial resistance will be responsible for causing 10 million annual deaths of the human population and economic suppression of about 1 trillion dollars, in addition, studies have shown that the annual Gross Domestic Product (GDP) may decrease by 1% globally, but approximately 5-7% for developing countries <sup>1</sup>.

The inappropriate and excessive use of antibiotics, both in humans and animals, is the main factor responsible for the selection of multidrug-resistant pathogenic bacteria<sup>2</sup>. Such estimates raise concerns both at the government level and among the final consumers of animal proteins<sup>3</sup>. In general, improving the host's immune defenses against pathogens helps to prevent antimicrobial resistance <sup>1,4</sup>.

This is because, according to the Committee on Medicinal Products for Veterinary Use of the European Community, increasing the immune status of herds promotes a reduction in the use of antibiotics, as it hinders the spread of pathogens, increases animal resilience against infections and reduces the need for antimicrobial therapy <sup>5</sup>.

The use of immunomodulators to enhance host defense responses has become a promising and growing strategy to mitigate antibiotic consumption. The concept of searching for livestock aligns with current global concerns about facing the challenge of antimicrobial multi-resistance <sup>6</sup>. Immunomodulators are chemical compounds capable of increasing or

suppressing the immune response to adjust it to a challenge, which may or may not be infectious <sup>7</sup>. This approach favors the use of endogenous host mechanisms to enhance the animal's defense against infectious agents<sup>8</sup>.

Within the concept of immunomodulation, betaglucan has been used as an oral immunopharmaceutical in production animals to increase their immune status <sup>5</sup>. This practice has been successfully performed in poultry <sup>9</sup>, pigs <sup>10</sup>, and fish <sup>11</sup>.

However, in ruminants, the use of betaglucan is still controversial. Research using this biopolymer suggests that bovine monocytes exposed in vitro increase the production of pro-inflammatory cytokines. Positively reflecting a pattern of trained immunity <sup>12</sup>. As it was observed that  $\beta(1,3)$  glucan improves productivity, and oxidative stress status and exerts an immunoenhancement effect in transition cows<sup>13</sup>. While for other approaches, no significant effects of betaglucan were found on the bovine immune system in vivo <sup>14, 15</sup>.

The explanation for the differences in biological responses between ruminants and monogastric animals is still unclear. There are no concrete data regarding the stability of betaglucan in the rumen. Studies of similar biopolymers (that have glycosidic bonds) in the ruminal environment, like cellulose <sup>16</sup> and chitosan <sup>17</sup>, show low ruminal stability due to intense cleavage of the polymeric chain by the action of the resident microbiota.

Overall, we aimed to evaluate the intra-ruminal behavior of four betaglucan products extracted from the same strain of *S.cerevisiae*, with variations in the culture medium and in the extraction process. Our focus is to generate information that would help the understanding of parameters that may alter the bioavailability of this immunopharmaceutical when administered to cattle.

## MATERIALS AND METHODS

**Sources of betaglucan, chitin and cellulose.** Four yeast-derived products were used in this experiment, obtained by industrial purification of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* (Biorigin, Lençóis Paulistas, São Paulo, Brazil). Three products were produced under controlled fermentation conditions, while the fourth product was obtained from the same yeast, but grown under anaerobic conditions in sugarcane juice. After industrial purification, the yeast culture was grown to autolysis where intracellular enzymes are activated by biological processing conditions, evolved into a partial deficiency of cell wall structures, followed by centrifugation and separation of the yeast extract from the yeast cell wall<sup>18</sup>. Through this processing, the purified yeast cell wall standard product (BG1) with a



beta-glucan concentration of 83% was obtained. subsequently, the purified yeast cell wall was observed in a chemical hydrolysis process by harvest <sup>19, 20</sup> in order to partially solubilize the outer layer of beta-glucan to obtain the soluble product Yeast Cell Wall (BG2) with a beta-glucan concentration of 45%. For the third product (BG3), in parallel to this process, other centrifugation steps were carried out, with a betaglucan concentration of 88%. The fourth product (BG4) undergoes the same process as BG3, but *S. cerevisiae* grows under anaerobic conditions and sugarcane juice, with a betaglucan concentration of 91%. Details of the extraction and purification processes could not be provided due to industrial secrecy concerns. Chitin (448877 Sigma-Aldrich) and cellulose nanocrystals were kindly provided by Embrapa Gado de Leite.

**Selection and maintenance of animals.** The in situ experiments were conducted with two Holstein cows permanently fistulated in the rumen, for animal nutrition experiments. The animals received water *ad libitum* and were fed a maintenance diet based on corn silage supplemented with corn and soy-based feed, given that silage is the most used roughage in feedlot dairy cattle. The compositional analysis of the diet was performed in duplicate at the food analysis laboratory at Embrapa Gado de Leite and is attached in Table 1.

Analysis	Sample 1	Sample 2	Mean	Standard Deviation
ASE (%)	92,85	92,37	92,61	0,24
CZ (%)	5,14	4,60	4,87	0,27
CZ FDN (%)	0,90	1,00	0,95	0,05
DIV-FDN (%)	40,96	45,20	43,08	2,12
DIVMS (%)	78,64	77,57	78,11	0,54
EB (Kcal/Kg)	4.327,41	4.348,81	4.338,11	10,70
EE saq. (%)	2,78	2,45	2,62	0,16
FDA (%)	22,12	21,57	21,85	0,28
FDN (%)	42,54	44,42	43,48	0,94
Lig (%)	0,29	0,08	0,19	0,11
PB (%)	6,02	5,49	5,76	0,26
PB-FDA (%)	0,57	0,60	0,59	0,02
PB-TBF (%)	2,02	1,99	2,01	0,02
PB-TCA (%)	2,17	2,10	2,14	0,03
PB-FDN (%)	1,40	1,41	1,41	0,01

**Table 1:** Proximate composition of the diet used in the experiment.

**Experimental design. Experiment 1.** Because it has a higher concentration of betaglucan and it is a co-product of the widely used bioenergy production process in Brazil, this experiment identified the chemical modifications that occur in betaglucan (BG4) in the ruminal environment. For this, three grams of BG4 were incubated in the rumen of cattle, with the aid of nylon bags<sup>21</sup> (ANKOM<sup>®</sup> F57), in duplicate, for a period of 24 hours. Samples were collected for scanning electron microscopy, mid-infrared spectroscopy and Raman spectroscopy at 0, 12 and 24 hours. **Experiment 2.** We aimed to evaluate the differences in ruminal stability of betaglucons produced with variations in culture media and extraction processes. For that, four different sources of betaglucan were used BG1, BG2, BG3, BG4. For this, 0,5 grams of betaglucan were incubated in the bovine rumen, from each of the respective sources of betaglucan, with the aid of nylon bags<sup>21</sup> (ANKOM<sup>®</sup> F57), in duplicate. Prior to incubation and immediately after incubation, all samples were dried in a drying oven at 65°C for 24 hours to determine dry matter. Samples were collected at incubation times 0, 6, 12, 24, 48, 72, 120 and 168h for analysis of infrared spectroscopy and UV-vis spectroscopy.

**Analysis by infrared spectroscopy.** In experiment 1 the spectra were obtained by Fourier Transform Infrared Spectroscopy using a Perkin Elmer FTIR spectrometer operating in absorption mode. Spectra were obtained in the range of 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ , and 32 scans were obtained using KBr pellets. In turn, in experiment 2, the spectra were obtained in a Bruker Alpha infrared spectrometer, in the region of interest, using an in situ attenuated total reflectance (ATR) accessory, with 128 scans and a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . All spectra were treated with the Origin 2021 program.

**Analysis by Raman spectroscopy.** The spectra were obtained in a Bruker FT Raman equipment, model FRS100, equipped with a germanium detector, cooled with liquid  $\text{N}_2$ , and excited with a 1064 nm Nd:YAG laser, with power of ca. 75 mW in the sample, with an average of 512 scans, and 4  $\text{cm}^{-1}$  of spectral resolution, in a range of 4000 to 50  $\text{cm}^{-1}$ .

**Scanning electron microscopy measurements.** Images were obtained using a Hitachi TM 3000 Electron Microscope, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan, with an accelerating voltage of 15 kV, under low vacuum, with different magnifications. The samples were fixed in the sample holder with carbon tapes.

**Colorimetric assay method for betaglucons using congo red.** The method was developed based on the specific chemical interaction that occurs between Congo red dye and  $\beta$ -D-glucans. As a consequence of this interaction, the electronic spectrum shifts from Congo red to longer wavelengths, which is associated with the concentration of betaglucons<sup>22</sup>. Thus, an aqueous solution of Congo red at 490  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  and solutions of 0.01 g of the samples

(chitin, cellulose, BG1, BG2, BG3, BG4) in 10 mL of aqueous solution containing 7% hydroxide sodium and 12% urea were prepared. However, for the solubilization of the samples it was necessary to carry out the process of freezing (-18 °C) and thawing once a day until completing 6 days<sup>23</sup>. After the samples were solubilized, 3 mL of their respective solutions were mixed with 1 mL of Congo red solution, the resulting solutions were stirred and the electronic spectra were obtained using a PG Instruments model T70 equipment. Finally, to obtain the Congo red electronic spectrum, 1 mL of its solution was mixed with 3 mL of the NaOH/urea solution.

## RESULTS AND DISCUSSION

In the case of experiment 1, Brazil is the world's largest producer of alcohol from sugarcane, a route for the production of green and highly sustainable biofuel<sup>24</sup>. *S. cerevisiae* is the most efficient yeast to carry out this fermentation process and, consequently, the betaglucan derived from this industrial process is widely available for use in animal production as an immunopharmaceutical. Thus, the initial study took place with the betaglucan sample extracted from alcoholic fermentation.

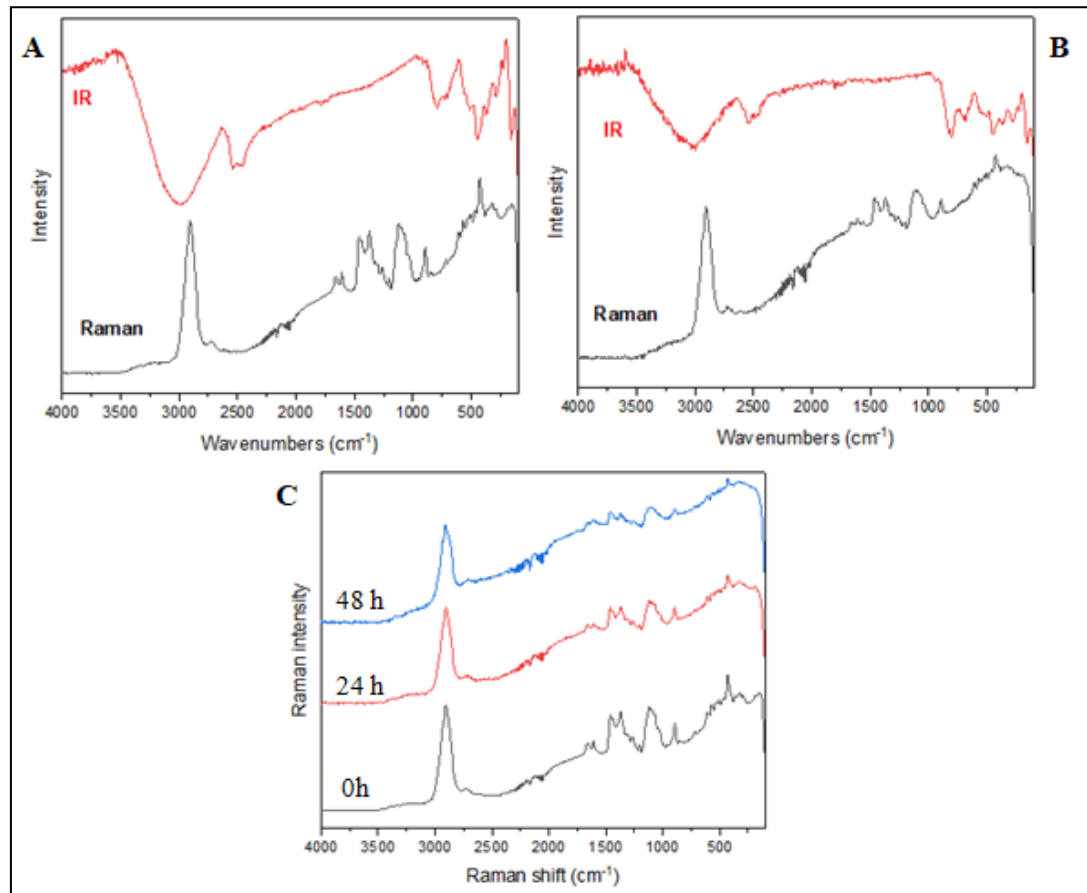
The use of betaglucan as an immunopharmaceutical is dependent on its absorption and ability to bind to cellular receptors of the immune system. Apparently, beta-glucans can be absorbed in the small intestine actively by transcytosis mediated by dectin-1 receptors or passively by paracellular route<sup>25</sup>. In turn, the activation of the immune system is mediated by the binding of betaglucan to cell receptors such as dectin-1, Toll-like 2 and 4 (TLR-2 and 4), lactosylceramide and complement 3 (CR-3)<sup>25, 26</sup>. Both characteristics are highly influenced by the molecular weight, degree of branching and spatial conformation of the betaglucan polymer chain, with these parameters being associated with its biological potency<sup>27</sup>. In general, it is considered that polymeric chains with less than seven monomeric units or of low molecular weight have little or no biological potency<sup>28</sup>. This is explained by the specificities of physicochemical interactions necessary for the activation of receptors by betaglucan to occur, such as the one that occurs between the amino acid residues Trp221 and His223 and betaglucan in dectin-1<sup>29</sup>. Similar interactions are also required to activate TLR 2 and 4<sup>30</sup>, CR3<sup>31</sup> and lactosylceramide<sup>32</sup> receptors.

Both the biological potency and the type of immune system response vary depending on the betaglucan application route (*i.e.* oral or parenteral)<sup>33</sup>. This difference can be attributed to a process of cleavage of the beta-glucan polymeric chain during its intestinal transit. In pigs, which have a monogastric digestive system, it is estimated that hydrolytic enzymes from

bacteria in the upper gastrointestinal tract are capable of inducing the depolymerization of beta-glucan by up to 80% until it reaches the end of the small intestine<sup>34</sup>. In the literature, there are no studies evaluating the stability of betaglucan in the ruminal environment. However, it is to be estimated that betaglucan is exposed to a more adverse environment than the digestive system of monogastric animals, since metagenomic data suggest that the rumen is colonized by a wide variety of microorganisms with the potential to produce endo and exo beta-glucosidases of the type  $\beta$  (1,3),  $\beta$  (1,4),  $\beta$  (1,6)<sup>35, 36, 37</sup>.

To assess the stability of betaglucan in the bovine rumen, the Raman and infrared spectra of the biopolymer were obtained prior to its ruminal incubation, which can be seen in figure 1 (A). The most intense band in both spectra can be attributed to the vibration modes of O-H bonds of the glycosidic structures, with absorption in the region of  $2900\text{ cm}^{-1}$ . The bands at  $1459$  and  $1371\text{ cm}^{-1}$  refer to typical modes of polysaccharide backbone, or the bands at  $1657$  and  $1608\text{ cm}^{-1}$ , refer to vibration modes of C=O and C=C bonds, respectively. Other bands present can also be attributed, such as  $1119$  and  $892\text{ cm}^{-1}$ , referring to the coupled modes  $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$  and  $\delta(\text{C-C-H}) + \delta(\text{C-O-C})$ , respectively. However, the most striking band can be observed at  $429\text{ cm}^{-1}$ , referring to the typical bond deformation mode (C-C-C) of the glycosidic structure<sup>38, 39, 40, 41, 42</sup>. With the spectroscopic data obtained, mainly based on Raman spectra, it is not possible to differentiate whether beta-glucan presents in some specific structural form, such as  $\beta$  (1,3) or  $\beta$ (1,6) glucan, strongly indicating that there is a mixture of the two shapes.

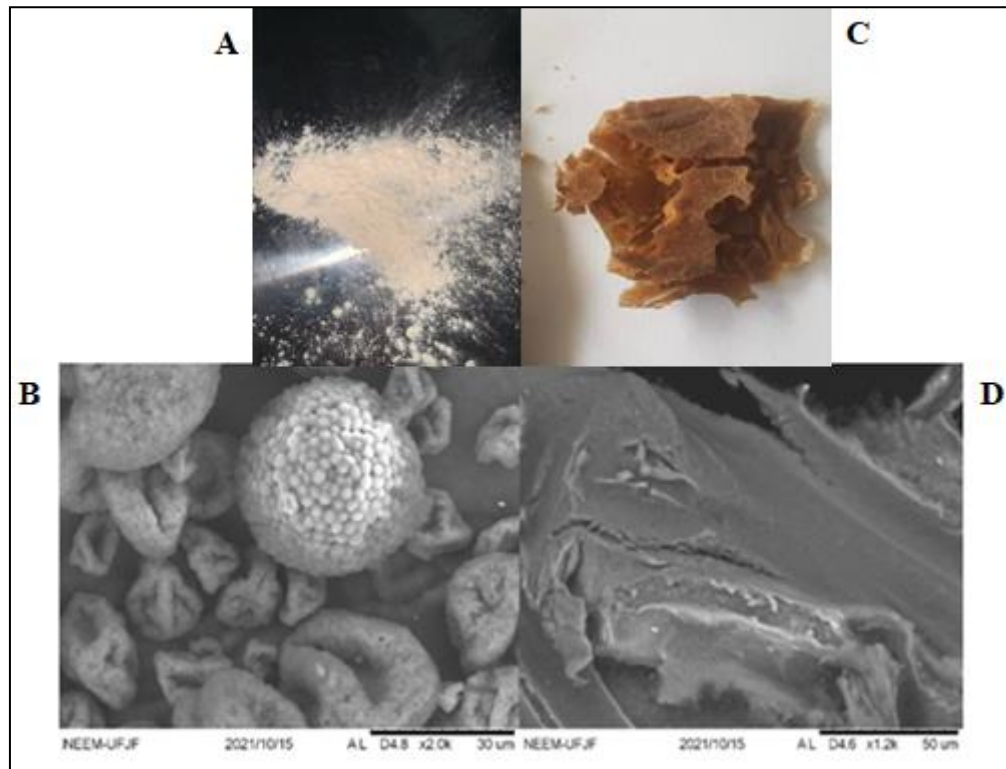
In figure 1(B), we can observe the Raman and infrared spectra of the betaglucan sample after incubation in 24 hours. In this figure, the quality of the spectra provides an indication of hydrolysis suffered by the sample, both in terms of relative intensities and in terms of band positions. It is well known from the literature that organic samples, under external effects that lead to the deterioration of their structural quality, show this degradation in their respective spectra<sup>43</sup>. In terms of comparison, the Raman spectra of the ruminal beta-glucan samples pre-incubation, 12 hours and 24 hours of ruminal incubation can be seen in figure 1 (C). In this, the band at  $2900\text{ cm}^{-1}$ , referring to the vibrational stretching mode of the C-H bond, in the three spectra has similar intensity. However as the incubation time progresses, a decrease in the intensity of the other bands is observed. This finding strongly suggests that the sample is undergoing a significant degradation process over time. Corroborating this interpretation, the shape of several of the bands also undergoes changes, being a strong indication of the degradation process.



**Figure 1.** (A) Raman and infrared spectra of pre-incubation ruminal betaglucon. (B) Raman and infrared spectra of the betaglucon sample after 24 hours of rumen incubation. (C) Betaglucon Raman spectra at 0h, 24h, and 48h of rumen incubation.

Processes of degradation of polymeric chains by the action of microorganisms can induce morphological alterations in the micrometric scale of the bulk polymer<sup>43</sup>. Thus, to assess the effects of the rumen microenvironment on betaglucon morphology, scanning electron micrographs were obtained pre-introduction of the rumen (Figure 2 B) and after 24 hours of exposure to the ruminal environment (Figure 2 D). In figure 7 A, the sample can be seen macroscopically in the form of powder and in figure 7 B (SEM) it can be seen the presence of spheroid and rough structures with a diameter ranging between 5 and 50 micrometers. Structures with similar morphology were reported. Alcohol fermentation processes cause yeast to produce thicker cell walls and betaglucon chains with a high degree of branching, which can be visualized by the SEM technique with irregular spheroid structures<sup>45</sup>. In turn, the betaglucons exposed to 24 hours of ruminal environment, an intense change in the morphology of the beta-glucon is observed, with it assuming an amorphous microscopic morphology both macroscopically and on SEM (Figure 7 C and D), respectively. This change in morphology can be explained by a reorganization of the betaglucon chains due

to biochemical changes in the ruminal environment, a polymer plastification process or a hydrolysis process. In fact, the disorganization of the triple helical helix of high molecular weight betaglucans into structures with a snail shape can occur due to changes in the liquid medium in which the betaglucan is found, but this seems to be a process that is unlikely to occur in the rumen, since it requires a pH greater than 10<sup>46</sup>. Other conformations of betaglucan that may be associated with the environment in which they are found are the double helix, random chains, rod and aggregate forms<sup>47</sup>. Although it cannot be ruled out, as the presence of new bands was not identified in the spectroscopic analyses, plasticization by low molecular weight substances is a phenomenon that betaglucan can suffer and impact on its morphology<sup>48</sup>. On the other hand, the action of beta-glucosidases from the ruminal microbiota is a mechanism of betaglucan degradation that is highly likely to be occurring. This hypothesis is supported both by the displacement and reduction of the band intensities of the infrared and Raman spectral bands of the material subjected to ruminal conditions, and by the vast literature that reports the occurrence of microbiota producing endo and exoglucanases in the rumen<sup>35, 36, 37</sup>, noting that longer oligosaccharides are better substrates for the action of exo- $\beta$ -1,3-glucanases extracted from rumen<sup>49</sup>.



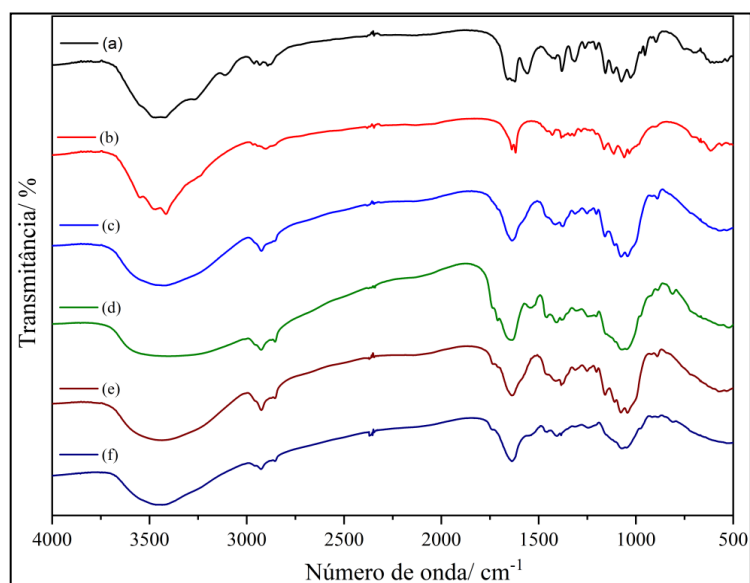
**Figure 2.** Images of betaglucan before (macroscopy) (A) and (SEM) (B) and after 24 hours of ruminal incubation (macroscopy) (C) and (SEM) (D).

Regarding experiment 2, betaglucons are among the main components of the cell wall of *S. cerevisiae* and make direct contact with the extracellular environment. This condition causes abiotic stresses to have a qualitative and quantitative impact on its biosynthesis. Thus, factors such as temperature, pH, cultivation time and carbon source for growth can impact the amount of betaglucan produced, its average molecular weight, the density of beta-type bonds, the ratio of alpha/beta bonds, the degree of branching and presence of beta bonds<sup>50, 45, 51</sup>. In turn, the beta-glucan extraction process involves extreme conditions of pH, temperature and mechanical action, which can promote the separation of betaglucan subgroups, or even hydrolysis of the original polymeric chain into lower molecular weight subunits<sup>52</sup>. Thus, considering the impact of the aforementioned variables on the final characteristics of betaglucan, an experiment was designed to evaluate the consequences on ruminal stability both of variations in the carbon source used for yeast growth and in the process of extracting betaglucan from a single strain of *S. cerevisiae*. Prior to ruminal incubation, four commercial betaglucan samples were characterized by infrared spectroscopy: BG1, BG2, BG3 and BG4.

Figure 3 shows the infrared absorption spectra of the studied samples and the supplementary table 2 shows the attempt to assign the bands according to the literature<sup>53, 54, 55</sup>.

56, 57, 58, 59, 60. Commercial compounds BG1, BG2, BG3 and BG4 are mostly composed of betaglucans, however, depending on their purification process, they may have impurities associated with fatty acids, lipids, proteins, among others <sup>61</sup>. However, the presence of chitin as an impurity is also reported, as it constitutes the cell wall of fungi and can also be covalently linked to  $\beta$ -glucan <sup>62, 63</sup>. Cellulose can also be present as an impurity depending on the process for obtaining betaglucan, for example if it is manufactured from sugar cane <sup>64</sup>.

In this context, infrared absorption spectra were obtained in order to identify impurities in different commercial samples. Thus, in the spectra of BG2 and BG3 it is possible to observe two pronounced shoulders around  $1700\text{ cm}^{-1}$  and in BG1 only one, which are not associated with the structure of betaglucan, but with impurities such as proteins and fatty acids <sup>65</sup>. The same is observed in the BG4 spectrum, however in a less pronounced way, indicating a lower presence of these compounds. Furthermore, in the spectrum of BG2 and BG3 it is observed that the bands at  $2927$  and  $2853\text{ cm}^{-1}$  are more intense, again indicating a greater amount of impurities.



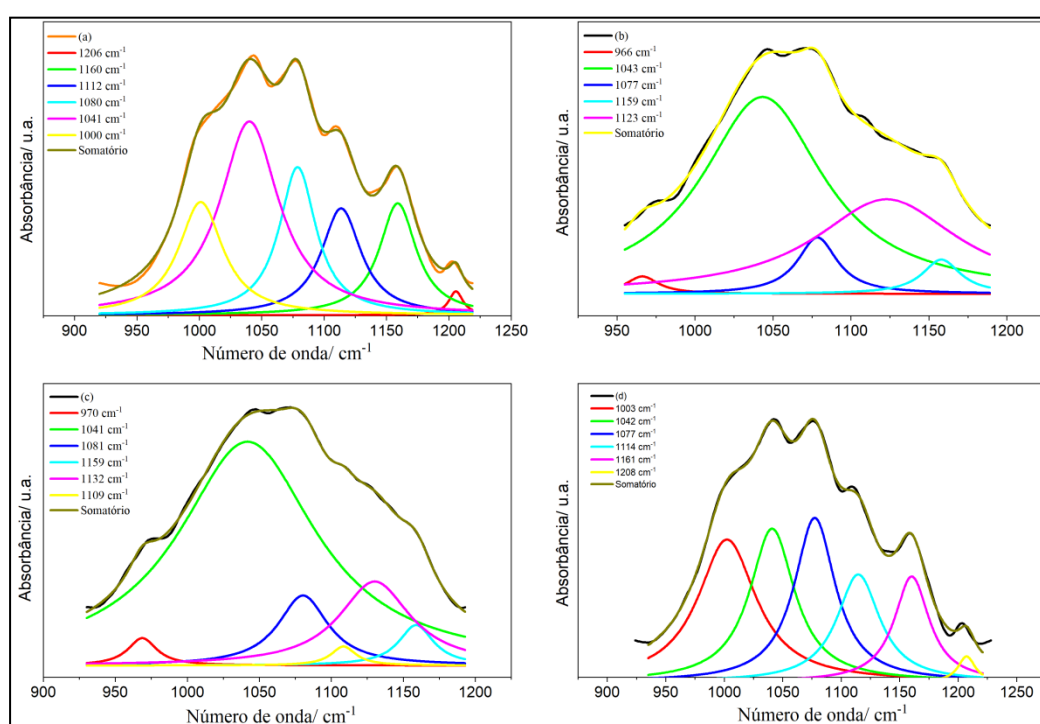
**Figure 3.** Infrared absorption spectrum of chitin (a), cellulose (b), BG4 (c), BG2 (d), BG3 (e) and BG1 (f)

In the spectra of all samples, the presence of a band around  $1635\text{ cm}^{-1}$  is verified, which is not characteristic of betaglucan and can be associated with  $\delta(\text{OH})$  of water molecules due to the humidity of the samples or the presence of chitin in the samples. However, the indication of the presence of chitin in the samples can be observed in the spectral region around  $1570\text{ cm}^{-1}$ . In the spectrum of BG1 and BG2, there is a well-defined



band and a pronounced shoulder, respectively, however for the other samples there is only a slightly pronounced shoulder. Regarding cellulose, it is not possible to propose its presence in the composition of the commercial samples, since a characteristic band is not observed in the spectra of the samples.

The region of the infrared absorption spectrum between  $900$  and  $1200\text{ cm}^{-1}$  has been used for the differentiation of  $\beta(1,3)$ ,  $\beta(1,4)$  and  $\beta(1,6)$  bonds one band is larger than the adjacent one, the distinction between them is difficult, even increasing the resolution of the instrument. However, it has been shown that mathematical procedures can be used to extract hidden structural information <sup>66</sup>. In this sense, figure 4 shows the deconvoluted spectra using the Lorentzian curve.



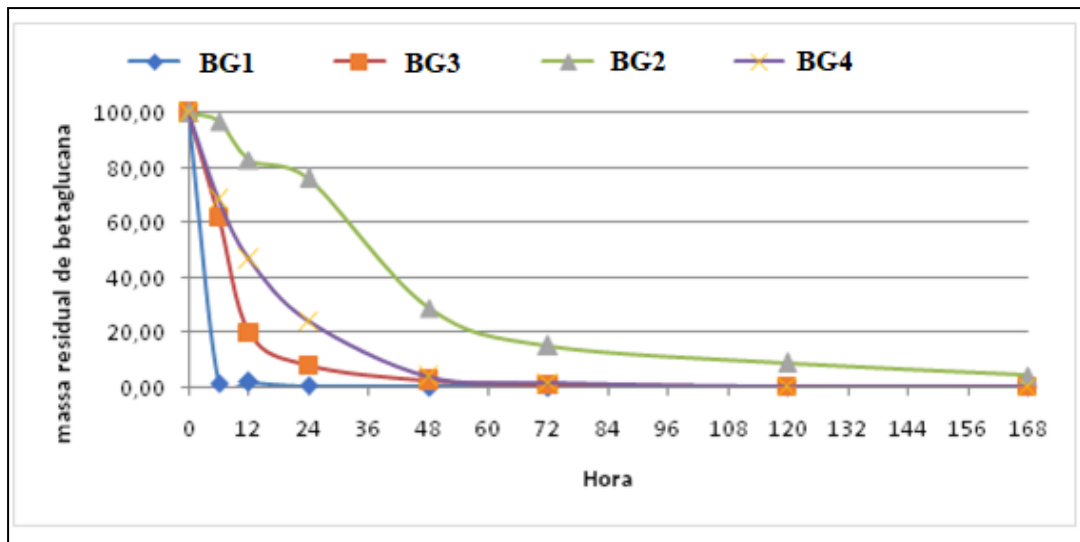
**Figure 4.** Deconvolution of the infrared absorption spectra of BG3 (a), BG2 (b), BG1 (c), BG4 (d).

The band around  $990\text{ cm}^{-1}$  is associated with the  $\beta(1,6)$  bond and can be identified in the spectra of samples BG3 and BG4, contributing significantly to the spectrum, but in the spectra of BG1 and BG2 these bands appear less intense. The bands around  $1160$ ,  $1120$ ,  $1075\text{ cm}^{-1}$  are associated with the  $\beta(1,6)$  bond and can be seen in the spectra of all samples. The first and third appear with greater contribution in the spectra of BG3 and BG4 and the second with the same contribution in all samples.

Regarding the bands that identify the  $\beta(1,4)$  bond, there is controversy in the literature, as a reference <sup>65</sup> indicates that the band around  $1025\text{ cm}^{-1}$  is associated with this  $\beta(1,4)$  and another <sup>67</sup> demonstrates this band in curdlan, a glucan with the presence of only a  $\beta(1,3)$  bond. The band at  $1042\text{ cm}^{-1}$  appears associated with  $\beta(1,3)$  <sup>65</sup> and  $\beta(1,4)$  <sup>68</sup> which makes its use inconsistent in identifying bonds.

However, from the results it can be inferred that samples BG3 and BG4 have a greater amount of glucans than BG1 and BG2, even taking into account the possible contribution of chitin in this analysis, since the last two presented a greater possibility presence of chitin. This conclusion is in agreement with the betaglucan concentration data provided by the manufacturer.

Once characterized, all commercial samples of betaglucans were incubated in bovine rumen for a period of 168 hours to assess mass loss and estimate their stability (**Figure 5**).

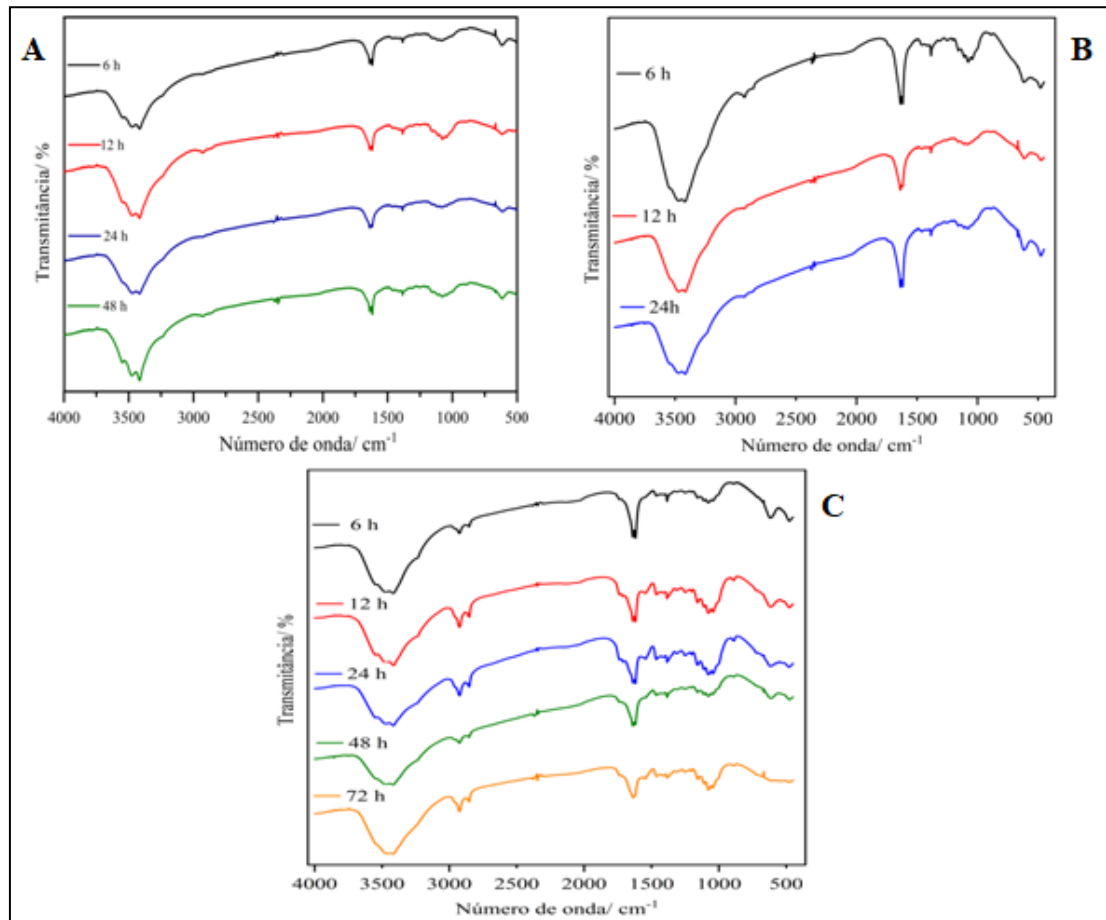


**Figure 5.** Comparison of the residual mass between the four betaglucan sources incubated in the bovine rumen for a period of 168 hours.

The BG1 sample showed the fastest mass loss, and was no longer detected in the rumen six hours after incubation. This suggests that the material is mainly composed of low molecular weight betaglucans, which solubilized or were rapidly degraded in the rumen. Both BG3 and BG4 underwent the same extraction and purification process, however BG3 was produced in culture medium, while BG4 was produced by alcoholic fermentation. Differences in the culture medium can promote the prioritization of metabolic pathways associated with the biosynthesis of betaglucan in *S. cerevisiae* <sup>69</sup>, interfering both in the amount of betaglucan, as well as in its molecular mass and branching degree <sup>50</sup>. Specifically, alcoholic fermentation can induce the production of beta-glucans with a higher degree of branching of the polymeric

chain and, therefore, with more rigid and thicker cell walls<sup>45</sup>. This condition may help explain the greater stability of betaglucan associated with BG4. On the other hand, the difference in ruminal stability observed between the betaglucons of BG1, BG2 and BG3 products can be attributed mainly to differences in the extraction process, which is known to produce betaglucan extracts with characteristics of molecular weight, conformation and degree of branching distinct, even if the source of betaglucan is common to all<sup>52,70</sup>.

Figure 6 (A) (B) and (C), shows the spectra of samples BG4, BG3 and BG2, respectively, after being submitted to the bovine ruminal environment for different times. Regarding the BG1 samples, it was not possible to obtain the spectra since after 6 h in the rumen system it had already been completely degraded. In the spectra of all samples at all times analyzed, bands around  $3500\text{ cm}^{-1}$  and  $1631/1818\text{ cm}^{-1}$  are observed, associated with the humidity of the samples and attributed to  $\nu(\text{OH})$  and  $\delta(\text{OH})$ , respectively. From the analysis of the BG4 spectrum, it is possible to observe the almost total absence of the bands at  $2926/850$  and  $890\text{ cm}^{-1}$ , referring to  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  and  $\beta$  binding, respectively. Furthermore, a significant decrease in the intensity of the bands in the regions between  $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  and  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ .



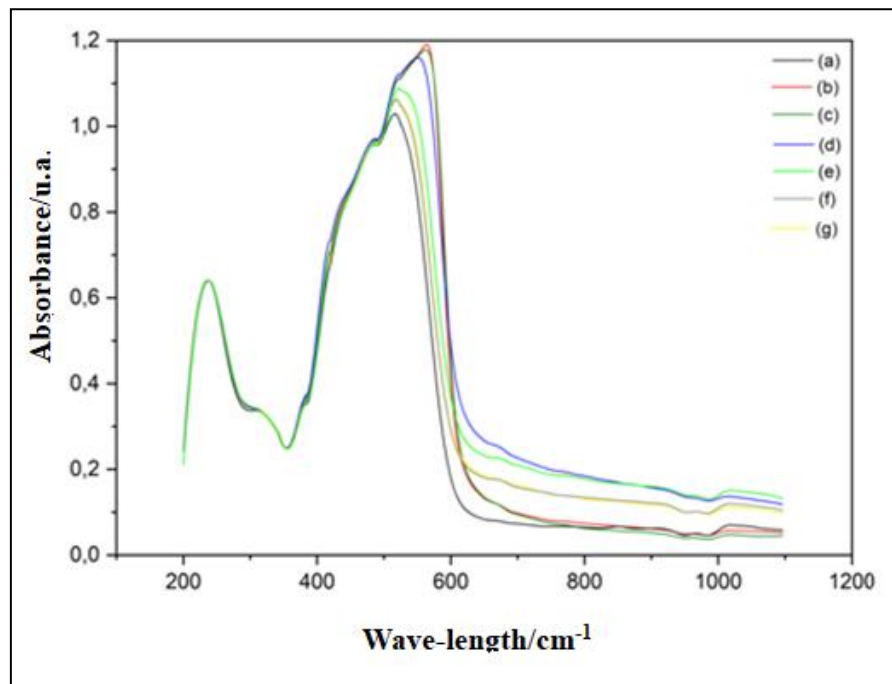
**Figure 6.** (A) Infrared absorption spectrum of BG4 after being submitted to the ruminal system for different periods. (B) Infrared absorption spectrum of BG3 after being submitted to the ruminal system for different periods. (C) Infrared absorption spectrum of BG2 after being submitted to the ruminal system for different periods.

Regarding the BG3 spectrum at 6 h, it is still possible to notice the bands at 2926/850 and 890  $\text{cm}^{-1}$  more clearly than in the BG4 spectrum, however over time these become less intense as well as in the BG4 spectrum. The same can be seen in the bands in the regions between 1500-1300  $\text{cm}^{-1}$  and 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ .

Regarding the BG2 spectra, it is observed that even after 72 hours, the bands at 2926/850 and 890  $\text{cm}^{-1}$  are significantly present in the spectra, in the same way as the bands in the regions at 1500-1300  $\text{cm}^{-1}$  and 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ , which only have their relative intensities changed. However, the formation of a new band is observed at 1730  $\text{cm}^{-1}$ , which can be attributed to  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , due to the formation of the C=O bond in the final group of the  $\beta$ -glucan molecule, after the scission of the  $\beta$  bond <sup>71</sup>. The formation of this band is also observed less intensely in the BG3 spectra. Finally, from the spectra it can be indicated that the BG2 sample presents greater stability to the rumen environment than the BG3 and BG4 samples, which is in agreement with the ruminal degradation test.

**UV-vis spectroscopy.** In the literature, Congo red is used to characterize tertiary structures of glucans, due to its interaction with the triple helix  $\beta(1,3)$  and  $\beta(1,6)$  of glucans, which causes a shift in the UV-vis spectrum to occur for longer wavelengths<sup>72, 22</sup>. Furthermore, it is described that Congo red does not interact with other polysaccharides. In both works, glucans extracted from mushrooms were solubilized at pH 7,0 using buffer solutions, phosphate buffer solution (NITSCHKE et al., 2011) and citric acid/sodium hydroxide buffer solution<sup>22</sup>. In this context, with the objective of comparing the displacement in the UV-vis spectrum of the different samples, the experiment was carried out in a similar way, modifying only the way of solubilization of the samples, since the samples are not soluble using the caps described earlier.

Figure 7 shows the UV-vis spectrum of the different samples analyzed and it is possible to observe that, unlike what has been described in the literature, the carbohydrates cellulose and chitin were the ones that interacted most with the Congo red dye and thus presented greater displacement in the spectrum UV-vis. This may be related to the different way used to solubilize the materials. It is noticed that the test in question is not specific for glucans, however taking into account that the dye interacts with polysaccharides in general, from the result obtained it can be inferred which samples present greater purity through the greater displacement of the UV-vis spectrum. Thus, BG4 has the highest purity, followed by BG3. BG1 and BG2 are the least pure, with similar purity. This result is in agreement with what was observed using the deconvolution of the spectrum in the infrared, which indicated BG3 and BG4 as purer.



**Figure 7.** UV-Vis spectrum of Congo red (a), chitin (b), cellulose (c), BG4 (d), BG3 (e), BG2 (f) and BG1 (g).

Based on our partial results, even though chemically the four products are betaglucan as they are produced from the same strain of yeast but with variations in the cultivation, extraction and purification processes, they can present different ruminal degradation behavior, which may impact its bioavailability. As a result based on the immunopharmacological behavior of BG, it is suggested that for the use of this biopolymer in cattle for a given biological application, specific studies of the ruminal behavior of the chosen BG are necessary so that protocols for its use and dose are defined. With that, it will hardly be possible to compare doses for ruminants obtained from different sources of BG or different processes of production and extraction of the same.

## REFERENCES

- (1) Pulingam, T.; Parumasivam, T.; Gazzali, A.M.; Sulaiman, A.M.; Chee, J.Y.; Lakshmanan, M.; Chin, C.F.; Sudesh, K., 2021. Antimicrobial resistance: prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 106103. Doi: 10.1016/j.ejps.2021.106103.
- (2) LARSSON, D. G.; FLACH, Carl-Fredrik. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 257-269, 2022. Doi: 10.1038/s41579-021-00649-x.

- (3) Gadde, U.; Kim, W.H.; Oh, S.T. and H.S. Lillehoj (2017) Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. **Animal health research reviews**. 18:26-45. Doi:10.1017/S1466252316000207.
- (4) HANDEL, Andreas; MARGOLIS, Elisa; LEVIN, Bruce, R. Exploring the role of the immune response in preventing antibiotic resistance. **Journal of theoretical biology**, v. 256, n. 4, p. 655-662, 2009. Doi: 10.1016/j.jtbi.2008.10.025.
- (5) Murphy, D.; Ricci, A.; Auce, Z.; Beechinor, J. G.; Bergendahl, H.; Breathnach, R., *et al.* (2017). EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). **EFSA J.** 15: e04666. Doi: 10.2903/j.efsa.2017.4666.
- (6) SCHEPETKIN, Igor A.; QUINN, Mark T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006. Doi: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.
- (7) KATSNELSON, Alla. Building a Healthy Herd without Antibiotics. **ACS Central Science**, v. 6, n. 1, p. 8, 2020. Doi: 10.1021/acscentsci.0c00009.
- (8) TZIANABOS, Arthur O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000. Doi: 10.1128/CMR.13.4.523.
- (9) Schwartz, B.; Vetvicka, V. Review:  $\beta$ -glucans as Effective Antibiotic Alternatives in Poultry. **Molecules** 2021, 26, 3560. Doi: 10.3390/molecules26123560).
- (10) PORNANEK, Pitukpol; PHOEMCHALARD, Chirasak. Dietary supplementation of beta-glucan-rich molasses yeast powder on antibody response to swine fever virus and hematology of starter-grower pigs. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 1, p. 1-6, 2021.
- (11) CHING, JooJie *et al.* Immunomodulatory activity of  $\beta$ -glucans in fish: Relationship between  $\beta$ -glucan administration parameters and immune response induced. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 5, p. 1824-1845, 2021. Doi: 10.1111/are.15086.
- (12) Pedro, A.R.V.; Lima, T.; Fróis-Martins, R.; Leal, B.; Ramos, I.C.; Martins, E.G.; Cabrita, A.R.J.; Fonseca, A.J.M.; Maia, M.R.G.; Vilanova, M. and Correia, A., (2021) Dectin-1-Mediated Production of Pro-Inflammatory Cytokines Induced by Yeast  $\beta$ -Glucans in Bovine Monocytes. **Frontiers in immunology**. 12:689879. Doi: 10.3389/fimmu.2021.689879.
- (13) Xia, W. H.; Wang, L.; Niu, X. D.; Wang, J. H.; Wang, Y. M.; Li, Q. L. & Wang, Z. Y. (2021). Supplementation with beta-1, 3-glucan improves productivity, immunity and

- antioxidative status in transition Holstein cows. *Research in Veterinary Science*, 134, 120-126. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.009>.
- (14) Uchiyama, H.; Iwai, A.; Asada, Y.; Muramatsu, D.; Aoki, S.; Kawata, K.; Kusano, K.; Nagashima, K.; Yasokawa, D.; Okabe, M.; *et al.* A Small Scale Study on the Effects of Oral Administration of the  $\beta$ -Glucan Produced by *Aureobasidium pullulans* on Milk Quality and Cytokine Expressions of Holstein Cows, and on Bacterial Flora in the Intestines of Japanese Black Calves. **BMC Research Notes** 2012, 5, 189. Doi: 10.1186/1756-0500-5-189.
- (15) Gimenes, G.; Días, E.; Días, B.; Gerbas, A.; Almada, A.; Borges, J. & Júnior, P. (2020). Eficácia da suplementação oral com 1,3-1,6 betaglucano proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 72(4), 1441-1448. Doi: 10.1590/1678-4162-10556.
- (16) Xing, B.; Han, Y.; Wang, X. C.; Wen, J.; Cao, S.; Zhang, K.; Li, Q.; Yuan, H. Persistent action of cow rumen microorganisms in enhancing biodegradation of wheat straw by rumen fermentation. **Science of the Total Environment**. 2020, 715, 136529. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136529.
- (17) SOUZA, Nelson Luis, G.D.; BRANDÃO, Humberto, M.; DE OLIVEIRA, Luiz Fernando C. Spectroscopic and thermogravimetric study of chitosan after incubation in bovine rumen. **Journal of Molecular Structure**, v. 1005, n. 1-3, p. 186-191, 2011. Doi: 10.1016/j.molstruc.2011.08.049.
- (18) Podpora, B.; Świdorski, F.; Sadowska, A.; Rakowska, R.; Wasiak-Zys, G. Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food. *Czech J. Food Sci.*, 2016; 34: 554–563. Doi: 10.17221/419/2015-CJFS.
- (19) Peat, S.; Whelan, W.J.; Edwards, T.E. Polysaccharides of baker's yeast. Part IV. Mannan. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1961; 29–34.
- (20) Ogawa, K.; Nishikori, J.; Ino, T.; Matsuda, K. Chemical Structures of Oligosaccharides Obtained from Partial Acid Hydrolysates of *Saccharomyces cerevisiae* Mannan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994; 58 (3): 560–562. Doi: 10.1271/bbb.58.560.
- (21) Grove, A. V.; Kaiser, C. R.; Iversen, N.; Hafla, A.; Robinson, B. L. & Bowman, J. G. P. (2006, June). Digestibility of barley beta-glucan in cattle. In **Western Section American Society of Animal Science** (Vol. 57, pp. 367-396).
- (22) SEMEDO, M. C.; KARMALI, A.; FONSECA, L. A high throughput colorimetric assay of  $\beta$ -1,3-d-glucans by Congo red dye. **Journal of Microbiological Methods**, 109, p. 140-148, 2015/02/01/ 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.020>.



- (23) ABDELAZIZ, R. M.; EL-MAGHRABY, A.; SADIK, W. A.A.; EL-DEMERDASH, A. G. M. *et al.* Biodegradable cellulose nanocrystals hydrogels for removal of acid red 8 dye from aqueous solutions. **Scientific Reports**, 12, n. 1, p. 6424, 2022/04/19 2022. Doi: 10.1038/s41598-022-10087-1.
- (24) Luz Jr, L. F. D. L.; Kaminski, M.; Kozak, R. H. & Ndiaye, P. M. (2009). Bioetanol, biodiesel e biocombustíveis: perspectivas para o futuro.
- (25) Hino, S.; Nishimura, N.; Matsuda, T.; Morita, T. Intestinal Absorption of  $\beta$ -Glucans and Their Effect on the Immune System. **Preprints** 2020, 2020120250. Doi: 10.20944/preprints202012.0250.v1.
- (26) Kim, H. S.; Hong, J. T.; Kim, Y. & Han, S. B. (2011). Stimulatory effect of  $\beta$ -glucans on immune cells. **Immune network**, 11(4), 191-195. Doi: 10.4110/in.2011.11.4.191.
- (27) Kaur, R.; Sharma, M.; Ji, D.; Xu, M.; Agyei, D., 2020. Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. **Fibers** 8, 1. Doi: 10.3390/fib8010001.
- (28) Adams, E.L.; Rice P.J.; Graves B., *et al.* Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2008; 325(1):115–123. Doi: 10.1124/jpet.107.133124.
- (29) Palma, A.S.; Feizi, T.; Zhang, Y.; Stoll, M.S.; Lawson, A.M.; Díaz-Rodríguez, E.; Campanero-Rhodes, M.A.; Costa, J.; Gordon, S.; Brown, G.D.; Chai, W. Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using “designer” microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, 281; 5771-5779, 2006). Doi: 10.1074/jbc.M511461200.
- (30) Lebron, F.; Vassallo, R.; Puri, V.; & Limper, A. H. (2003). Pneumocystis carinii cell wall  $\beta$ -glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF- $\kappa$ B activation. **Journal of Biological Chemistry**, 278(27), 25001-25008. Doi: 10.1074/jbc.M301426200.
- (31) Xia, Y.; Větvička, V.; Yan, J.; Hanikýrová, M.; Mayadas, T. & Ross, G. D. (1999). The  $\beta$ -glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. **The Journal of Immunology**, 162(4), 2281-2290. Doi: 10.4049/jimmunol.162.4.2281.
- (32) JIMENEZ-LUCHO, Victor; GINSBURG, V.; KRIVAN, H. C. Cryptococcus neoformans, Candida albicans, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal beta 1-4Glc beta 1-1Cer), a possible adhesion receptor for

- yeasts. **Infection and immunity**, v. 58, n. 7, p. 2085-2090, 1990. Doi: 10.1128/iai.58.7.2085-2090.1990.
- (33) Vetvicka, V., & Vetvickova, J. (2008). A comparison of injected and orally administered  $\beta$ -glucans. **JANA**, 11(1), 42-49.
- (34) Holtekjølen, A. K.; Vhile, S. G.; Sahlstrøm, S.; Knutsen, S. H.; Uhlen, A. K.; Åssveen, M., & Kjos, N. P. (2014). Changes in relative molecular weight distribution of soluble barley beta-glucan during passage through the small intestine of pigs. **Livestock Science**, 168, 102-108). Doi: 10.1016/j.livsci.2014.06.027.
- (35) Belzecki, G.; Miltko, R.; & Michalowski, T. (2012). Ability of rumen protozoa *Diploplastron* affine to utilize  $\beta$ -glucans. **Folia microbiologica**, 57(4), 259-262. Doi: 10.1007/s12223-012-0120-y.
- (36) Badhan A.; Low K. E.; Jones D. R.; Xing X.; Raza M.; Milani M., *et al.* (2022). Mechanistic insights into the digestion of complex dietary fibre by the rumen microbiota using combinatorial high-resolution glycomics and transcriptomic analyses. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. 20 148–164. Doi: 10.1016/j.csbj.2021.12.009.
- (37) Gao, D. Y.; Sun, X. B.; Fang, Y.; He, B.; Wang, J. H.; Liu, J. X & Wang, Q. (2022). Heterologous expression and characterization of two novel glucanases derived from sheep rumen microbiota. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 38(5), 1-14. Doi: 10.1007/s11274-022-03269-6.
- (38) EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; WEBSTER, D. FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 53, n. 13, p. 2383-2392, 1997. Doi: 10.1016/S1386-1425(97)00178-9.
- (39) Almeida, M. R.; Alves, R. S.; Nascimbem, L. B.; Stephani, R.; Poppi, R. J. & de Oliveira, L. F. C. (2010). Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 397(7), 2693-2701. Doi: 10.1007/s00216-010-3566-2.
- (40) Du, L.; Zhang, X.; Wang, C.; & Xiao, D. (2012). Preparation of water soluble yeast glucan by four kinds of solubilizing processes. **Engineering**, 4(10B), 184-88.
- (41) Alves, A. P. P.; de Oliveira, L. P.; Castro, A. A.; Neumann, R.; de Oliveira, L. F.; Edwards, H. G., & Sant'Ana, A. C. (2016). The structure of different cellulosic fibres characterized by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 324-330, 2016. Doi: 10.1016/j.vibspec.2016.08.007.

- (42) BOUTROS, Jean A.; MAGEE, Andrew S.; COX, Donald. Comparison of structural differences between yeast  $\beta$ -glucan sourced from different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processed using proprietary manufacturing processes. **Food Chemistry**, v. 367, p. 130708, 2022. Doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130708.
- (43) Khatibi, S.; Ostadhassan, M.; Tuschel, D.; Gentzis, T. & Carvajal-Ortiz, H. (2018). Evaluating molecular evolution of kerogen by raman spectroscopy: correlation with optical microscopy and rock-eval pyrolysis. **Energies**, 11(6), 1406. Doi: 10.3390/en11061406.
- (44) Cangemi, J. M.; Claro Neto, S.; Chierice, G. O. & Santos, A. M. D. (2006). Study of the biodegradation of a polymer derived from castor oil by scanning electron microscopy, thermogravimetry and infrared spectroscopy. *Polímeros*, 16, 129-135 Doi: 10.1590/S0104-14282006000200013.
- (45) BASTOS, Rita; COELHO, Elisabete; COIMBRA, Manuel A. Modifications of *Saccharomyces pastorianus* cell wall polysaccharides with brewing process. **Carbohydrate polymers**, v. 124, p. 322-330, 2015.
- (46) Manabe, N.; & Yamaguchi, Y. (2021). 3D Structural Insights into  $\beta$ -Glucans and Their Binding Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(4), 1578. Doi: 10.3390/ijms22041578.
- (47) Wang, Q.; Sheng, X.; Shi, A.; Hu, H.; Yang, Y.; Liu, L.; Fei, L.; Liu, H.  $\beta$ -Glucans: Relationships between modification, conformation and functional activities. **Molecules** 2017, 22, 257. Doi: 10.3390/molecules22020257.
- (48) Sagnelli, D.; Kirkensgaard, J. J.; Giosafatto, C. V. L.; Ogrodowicz, N.; Kruczała, M.S.; Mikkelsen, J.E.; Maignet, D.; Lourdin, K.; Mortensen, A.; Blennow. All-natural bioplastics using starch-beta-glucan composites. **Carbohydrate Polymers**. 72 (2017), pp. 237-245. Doi: 10.1016/j.carbpol.2017.05.043.
- (49) Kalyani, D. C.; Reichenbach, T.; Aspeborg, H. & Divne, C. (2021). A homodimeric bacterial exo- $\beta$ -1, 3-glucanase derived from moose rumen microbiome shows a structural framework similar to yeast exo- $\beta$ -1, 3-glucanases. **Enzyme and microbial technology**, 143, 109723. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109723.
- (50) Naruemon, M.; Romanee, S.; Cheunjit, P.; Xiao, H.; McLandsborough, L. A. & Pawadee, M. (2013). Influence of additives on *Saccharomyces cerevisiae* [Beta]-glucan production. **International Food Research Journal**, 20(4), 1953.
- (51) Varelas, V.; Liouni, M.; Calokerinos, A. C.; & Nerantzis, E. T. (2016). An evaluation study of different methods for the production of  $\beta$ -D-glucan from yeast biomass. **Drug testing and analysis**, 8(1), 46-55. Doi: 10.1002/dta.1833.

- (52) Maheshwari, G.; Sowrirajan, S.; & Joseph, B. (2017). Extraction and Isolation of  $\beta$ -Glucan from Grain Sources—A Review. *Journal of food science*, 82(7), 1535-1545. Doi: 10.1111/1750-3841.13765.
- (53) CÁRDENAS, G.; CABRERA, G.; TABOADA, E.; MIRANDA, S. P. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and <sup>13</sup>C cross polarization/mass angle spinning NMR. **Journal of Applied Polymer Science**, 93, n. 4, p. 1876-1885. Doi: 10.1002/app.20647.
- (54) OH, S. Y.; YOO, D. I.; SHIN, Y.; SEO, G. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. **Carbohydrate Research**, 340, n. 3, p. 417-428. Doi: 10.1016/j.carres.2004.11.027.
- (55) NOVÁK, M.; SYNITSYA, A.; GEDEON, O.; SLEPIČKA, P. *et al.* Yeast  $\beta(1-3)$ ,  $(1-6)$ -d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, 87, n. 4, p. 2496-2504. Doi: 10.1016/j.carbpol.2011.11.031
- (56) SYNITSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, 2, n. 2, p. 17, 2014/10/22. Doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07.
- (57) KOVALEVA, E.; PESTOV, A.; STEPANOVA, D.; MOLOCHNIKOV, L. (2016) Characterization of chitin and its complexes extracted from natural raw sources. **AIP Conference Proceedings**, 1772, n. 1, p. 050007. Doi: 10.1063/1.4964577.
- (58) LIU, Y.; KIM, H. J. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Simple Algorithm Analysis for Rapid and Non-Destructive Assessment of Developmental Cotton Fibers. **Sensors (Basel)**, 17, n. 7, 2017/06/24. Doi: 10.3390/s17071469.
- (59) MILHOMENS, G. C.; DE ALMEIDA, C. G.; DE SOUSA SALOMÃO ZANETTE, R.; DE SOUZA, N. L. G. D. *et al.* (2018). Biocompatibility and adsorption properties of hydrogels obtained by graft polymerization of acrylic acid on cellulose from rice hulls. **Iranian Polymer Journal**, 27, n. 12, p. 1023-1032. Doi: 10.1007/s13726-018-0672-z.
- (60) GIEROBA, B.; SROKA-BARTNICKA, A.; KAZIMIERCZAK, P.; KALISZ, G. *et al.* Effect of Gelation Temperature on the Molecular Structure and Physicochemical Properties of the Curdlan Matrix: Spectroscopic and Microscopic Analyses. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, n. 17, 2020/08/30. Doi: 10.3390/ijms21176154.
- (61) BZDUCHA-WRÓBEL, A.; KOCZOŃ, P.; BŁAŻEJAK, S.; KOZERA, J. *et al.* Valorization of Deproteinized Potato Juice Water into  $\beta$ -Glucan Preparation of *C. utilis* Origin: Comparative Study of Preparations Obtained by Two Isolation Methods. **Waste and Biomass Valorization**, 11, n. 7, p. 3257-3271. Doi: 10.1007/s12649-019-00641-w.

- (62) SIETSMA, J. H.; WESSELS, J. G. H. Evidence for Covalent Linkages between Chitin and  $\beta$ -Glucan in a Fungal Wall. **Microbiology**, 114, n. 1, p. 99-108. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-99>. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01713.x.
- (63) CHEN, A.; PAN, F.; ZHANG, T.; YU, C. *et al.* (2021). Characterization of chitin-glucan complex from Tremella fuciformis fermentation residue and evaluation of its antibacterial performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, 186, p. 649-655. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.048.
- (64) PAGLIUSO, D.; GRANDIS, A.; DE SOUSA, C. R.; DE SOUZA, A. P. *et al.* The Effect of Sugarcane Straw Aging in the Field on Cell Wall Composition. **Frontiers in plant science**, 12, p. 652168, 2021/08/03. Doi: 10.3389/fpls.2021.652168.
- (65) PENGKUMSRI, N.; SIVAMARUTHI, B.; SIRILUN, S.; PEERAJAN, S. *et al.* (2016). Extraction of  $\beta$ -glucan from Saccharomyces cerevisiae: Comparison of different extraction methods and in Vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. **Food Science and Technology (Campinas)**, 37. Doi: <https://doi.org/10.1590/1678-457X.10716>.
- (66) GALICHET, A.; SOCKALINGUM, G. D.; BELARBI, A.; MANFAIT, M. FTIR spectroscopic analysis of Saccharomyces cerevisiae cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **FEMS Microbiol Lett**, 197, n. 2, p. 179-186, 2001/04/21. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10601.x.
- (67) GIEROBA, B.; SROKA-BARTNICKA, A.; KAZIMIERCZAK, P.; KALISZ, G. *et al.* Surface Chemical and Morphological Analysis of Chitosan/1,3- $\beta$ -d-Glucan Polysaccharide Films Cross-Linked at 90 °C. **International Journal of Molecular Sciences**, 23, n. 11, 2022/06/11. Doi: 10.3390/ijms23115953.
- (68) CHAIYASUT, C.; PENGKUMSRI, N.; SIVAMARUTHI, B.; SIRILUN, S. *et al.* Extraction of B-glucan of Hericium erinaceus, Avena sativa L., and Saccharomyces cerevisiae and in vivo evaluation of their immunomodulatory effects. **Food Science and Technology**, 38. Doi: 10.1590/fst.18217.
- (69) Shahinian, S.; & Bussey, H. (2000).  $\beta$ -1,6-Glucan synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular microbiology*, 35(3), 477-489.
- (70) Caseiro, C.; Dias, J. N. R.; de Andrade Fontes, C. M. G. & Bule, P. (2022). From Cancer Therapy to Winemaking: The Molecular Structure and Applications of  $\beta$ -Glucans and  $\beta$ -1,3-Glucanases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3156. Doi: 10.3390/ijms23063156.
- (71) LUAN, L. Q.; VU, N. T.; NGHIA, N. T.; THAO, N. H. P. Synergic degradation of yeast  $\beta$ -glucan with a potential of immunostimulant and growth promotor for tiger shrimp.

**Aquaculture Reports**, 21, p. 100858. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235251342100274X>.

(72) NITSCHKE, J.; MODICK, H.; BUSCH, E.; VON REKOWSKI, R. W. *et al.* A new colorimetric method to quantify  $\beta$ -1,3-1,6-glucans in comparison with total  $\beta$ -1,3-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, 127, n. 2, p. 791-796. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611000628>.

### SUPPLEMENTARY FILE

**Supplementary Table 3.** Attempted vibrational assignment based on similar polysaccharides and electronic structure calculations from the literature.

Chitin	Cellulose	BG4	BG2	BG3	BG1	Attribution Attempt
3347	3541/3473/3414	3430	3457		3233	$\nu(\text{OH})$
3266/310						$\nu_s(\text{NH})$
0						$\nu_{\text{as}}(\text{CH}(-\text{CH}_3))$
2962						$\nu_{\text{as}}(\text{CH}(-\text{CH}_2-))$
2931						$\nu_s(\text{CH}(-\text{CH}_2-))$
2891						$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
	2902/2859	2925	2927		2926	$\nu_s(\text{CH}_2)$
		2861	2853		2853	$\nu(\text{C}=\text{O})$
		1707	1734/171	1738/170	1739	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1658		1635	1641	1635	1633	$\nu(\text{C}=\text{O})$
	1633/1615					$\delta(\text{OH})$
1559/131						$\delta(\text{NH})$ e $\nu(\text{CN})$
1						$\delta(\text{O}-\text{CH}_3)$ , $\delta(\text{HCH})$ , $\delta(\text{HOC})$ e $\delta(\text{CH})$
		1459	1456	1456	1456	

	1425/1383/1339 /1319/1278					$\delta(\text{CH}_2)$
1414						$\delta_s(\text{CH}(-\text{CH}_2-))$
		1375	1377	1379	1386	$\delta(\text{CH})$ e $\delta(\text{COH})$
1376						$\delta_{as}(\text{CH}(-\text{CH}_2-))$
		1315	1307	1311	1311	$\delta(\text{CH})$ e $\delta(\text{OH})$
1262						$\delta(\text{NH})$
		1251/1201	1245/1206	1249/1204	1246	$\delta(\text{CCH})$
1157	1161	1159	1152	1159	1157	$\nu(\text{C-O-C})$ da ligação glicosídica
1114/1073/1030	1202/1118/1058/ 1013	1418/1077	1071/1414	1414/1077	1408/1070	$\nu(\text{C-O})$
		1105	1110	1107	1110	$\nu(\text{C-O})$ e $\nu(\text{C-C})$
953						$\delta(\text{CH}_3)$
		1043	1043	1041	1046	$\delta(\text{CC}), \delta(\text{COH}),$ $\delta(\text{CH})$
		890	883	887	892	$\delta(\text{HCC}),$ $\delta(\text{HCO}),$ $\delta(\text{CH})$ e
	896					Ligação $\beta$ Ligação $\beta$