

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS**

Francine dos Santos Ramos

**Inibição de biofilmes bacterianos por
resíduos obtidos do processamento
de soja (*Glycine max*)**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2019**

Francine dos Santos Ramos

Inibição de biofilmes bacterianos por resíduos obtidos do processamento de soja (*Glycine max*)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador(a): Dr^a Karine Rigon Zimmer

**Porto Alegre
2019**

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Cocos Gram-positivos e de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), com colaboração de laboratórios da Faculdade de Farmácia e do Centro de Biotecnologia instituídos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Laboratório de Bioquímica e Toxicologia de *Caenorhabditis elegans* situado na Universidade do Pampa (UNIPAMPA), sendo financiado pelos seguintes órgãos de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Como não poderia ser diferente, agradeço primeiramente a minha mãe Elígia, pelas diversas formas de apoio e incentivo e pela motivação constante de investir nos estudos. Obrigada pela parceria, pelos puxões de orelha e por sempre ser um exemplo de dedicação e esforço. Obrigada mãe, sem você essa conquista não seria possível.

Agradeço imensamente a professora Karine Zimmer pela orientação e paciência. Por dividir seu conhecimento e possibilitar a realização deste projeto, que com certeza contribuiu não somente para minha formação profissional, como também com lições importantes para a vida pessoal. Obrigada pelo exemplo de profissional e pessoa que és.

Agradeço às professoras Aline Zimmer, Adriana Seixas e Daiana Ávila pelas colaborações neste projeto, fundamentais para sua execução e finalização.

Agradeço às professoras Danielle Trentin e Ana Paula Frazzon pela participação como comissão de acompanhamento e por contribuírem de forma tão significativa para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por compartilharem desta experiência e pela convivência. Aos mais que colegas, amigos, João Pedro Sagini, Dérík Midon e Fernanda Rossato, deixo meus agradecimentos especiais por tudo.

Agradeço aos amigos e à família pelo incentivo, solidariedade e compreensão, pois nem sempre pude estar tão perto quanto gostaria. Vocês são demais!

Agradeço às agências de fomento e instituições de ensino às quais possibilitaram a realização deste trabalho e contribuíram para a minha formação.

Obrigada!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	06
Lista de figuras	07
Resumo	08
Abstract	09
1. Referencial teórico	10
1.1 Soja (<i>Glycine max</i>).....	10
1.1.1. Resíduos provenientes do processamento da soja	12
1.2 Biofilmes bacterianos – aspectos gerais, problemática e estratégias de controle	15
1.2.1. Aspectos gerais de biofilmes bacterianos	15
1.2.2. Biofilmes bacterianos – problemática e impacto econômico	20
1.2.3. Estratégias de controle e combate a biofilmes bacterianos	23
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	24
1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
1.5 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental no estudo de biofilmes	26
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Resultados	29
3.1 Manuscrito artigo científico Soybeans agroindustrial residues as staphylococcal biofilm inhibitors	30
4. Discussão	69
5. Conclusões	76
6. Referências bibliográficas	77

LISTA DE ABREVIATURAS

β CG: beta conglucina

DMI: dispositivo médico invasivo

EPS: *extracellular polymeric substances* (matriz exopolimérica)

IRAS: infecções relacionadas à assistência em saúde

QS: *quorum sensing*

TCS: *two-component systems* (sistema de dois componentes)

UFC: unidade formadora de colônia

UTI: unidade de tratamento intensivo

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1. Grãos de soja em fase de colheita.

Figura 2. Etapas fundamentais da formação de biofilme.

Figura 3. Fatores/interações físico-químicos (as) relacionados à adesão bacteriana em superfícies abióticas.

Figura 4. *Caenorhabditis elegans* em microscopia com contraste de interferência diferencial.

RESUMO

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais tem sido alvo de diversas pesquisas, uma vez que apresentam uma rica composição química, seu descarte gera custos às indústrias e prejuízos ao meio ambiente. Entre esses resíduos destacam-se os da soja, um grão com comprovadas atividades benéficas à saúde humana. A busca por compostos ativos contra biofilmes, definidos como comunidades microbianas aderidas a superfícies, tem sido extremamente importante, uma vez que são considerados desafios nos ambientes clínicos e industriais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencial atividade antibiofilme e antimicrobiana de extratos obtidos de resíduos do processamento da soja contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resíduos obtidos foram submetidos a um processo de extração por ultrassom, utilizando-se água como solvente. As atividades antibacteriana e antibiofilme de dois extratos brutos foram avaliadas por absorbância (620 nm), contagem de UFC e método de cristal violeta. O extrato obtido de fragmentos de grão e cascas (E1) apresentou maior atividade antibiofilme, sendo escolhido para caracterização química por cromatografia em camada delgada e métodos colorimétricos, tratamentos térmico e enzimático, fracionamento em coluna cromatográfica (CC – cromatografia de exclusão molecular) e processos de ultracentrifugação. E1 (4 mg/mL) inibiu em 75% a formação de biofilme por *S. epidermidis* sem inibição de crescimento. A caracterização química mostrou a presença de aminoácidos, saponinas, terpenos e esteroides. A atividade antibiofilme de E1 foi perdida quando este foi submetido a tratamento térmico enquanto o tratamento enzimático levou a perda de 30% na atividade do extrato, sugerindo que as moléculas antibiofilme podem ser de origem proteica. Duas frações obtidas da CC foram capazes de inibir em aproximadamente 35% a formação de biofilme de *S. epidermidis*. A partir do processo de ultracentrifugação, a atividade antibiofilme foi observada apenas quando duas frações (fração > 50 kDa e fração <10 kDa) foram combinadas, sugerindo que a atividade biológica é dependente do sinergismo das moléculas ativas. Nossos resultados demonstraram que o efeito antibiofilme é alcançado com apenas 6 h de tratamento com E1 e sugere que a atividade biológica é via efeito físico, uma vez que sua propriedade antibiofilme é observada apenas quando em contato direto com as células bacterianas. Além disso, o tratamento agudo com o E1 não causou nenhum efeito tóxico em *Caenorhabditis elegans*, no entanto, a exposição crônica causou redução na sobrevivência d vermes, aumento do tamanho corporal e aumento da expressão de GST-4. Este trabalho mostra que os resíduos agroindustriais da soja podem ser uma fonte potencial de moléculas com atividade contra biofilmes bacterianos e com baixa toxicidade *in vivo*, sendo esta manejada pela concentração utilizada.

Palavras-chave: soja; resíduos agroindustriais; antibiofilme; *S. aureus*; *S. epidermidis*

ABSTRACT

The reuse of agroindustrial waste has been the subject of several researches, since since they have a rich chemical composition, their disposal generates costs to the industries and potential harmful to the environment. Among these residues stand out these from soybeans, a grain with proven beneficial activities to human health. The search for active compounds against biofilms, which are defined as microbial communities attached to surfaces, has been extremely important, since they are challenges in clinical and industrial environments. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential antibiofilm and antimicrobial activities of extracts obtained from soybeans processing residues in the following bacteria *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The residues used were subjected to an ultrasonic extraction process, using water as solvent. The antibacterial and antibiofilm activities of two crude extracts were evaluated using absorbance (620 nm), UFC counting and the crystal violet method. The extract obtained from fragments of the grain and stalks (E1) presented major antibiofilm activity, being chosen for chemical characterization using thin layer chromatography and colorimetric methods, thermal and enzymatic treatments, fractionation in column chromatography (CC - size exclusion chromatography) and ultracentrifugation processes. E1 (4 mg/mL) inhibited in 75% the formation of *S. epidermidis* biofilm without inhibition of growth. Chemical characterization showed the presence of amino acids, saponins, terpenes and steroids. Antibiofilm activity of E1 was lost when it was submitted to heat treatment while the enzymatic treatment led to the loss of 30% in the activity of the extract, suggesting that the antibiofilm molecules may be of protein origin. Two fractions obtained from CC were able to inhibit by approximately 35% the biofilm formation of *S. epidermidis*. From the ultracentrifugation process, antibiofilm activity was observed only when two fractions (fraction > 50 kDa and fraction <10 kDa) were combined, suggesting that the biological activity is dependent on the synergism of the active molecules. Our results demonstrated that the antibiofilm effect is achieved with just 6 h of treatment with E1 and suggests that the biological activity is via physical effect, since its antibiofilm activity is observed only when in direct contact with bacterial cells. In addition, acute treatment with E1 extract did not cause any toxic signs in *Caenorhabditis elegans*, however chronic exposure caused reduced worms survival, increased body length and increased GST-4 expression. This work shows that soybeans agroindustrial residues may be a potential source of molecules with activity against bacterial biofilms and with low toxicity *in vivo*, which can be managed by the concentration used.

Keywords: soybeans; agroindustrial residues; antibiofilm; *S. aureus*; *S. epidermidis*

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Soja (*Glycine max*)

A soja (*Glycine max*) (figura 1) é uma leguminosa originária da Ásia (BRACHFELD & CHOATE, 2007), conhecida por conter elevadas quantidades de proteínas e baixas quantidades de gorduras saturadas e colesterol, sendo considerada um alimento funcional (SILVA *et al.*, 2006; PONNUSHA *et al.*, 2011). A soja e seus produtos derivados estão entre os mais consumidos mundialmente, sendo utilizados em diversos setores industriais, principalmente na alimentação humana e animal e na produção de biocombustíveis (CHEN *et al.*, 2012; HO *et al.*, 2014). O Brasil é um de seus maiores produtores e o Rio Grande do Sul apresenta-se como terceiro estado com a maior produção deste grão, sendo uma das culturas mais importantes economicamente (CONAB, 2017).



Figura 1. Grãos de soja em fase de colheita. (Figura disponível em: <http://denisegomesludwig.blogspot.com.br/2015/05/19-de-maiosojaleguminosa-planta.html>). Acesso em 19 de novembro de 2018.

O reconhecimento e a popularização da soja como um alimento benéfico à saúde humana se devem ao fato deste grão possuir em sua composição química

diversas moléculas com propriedades bioativas. Os grãos de soja são constituídos basicamente por proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, minerais e metabólitos secundários (compostos fitoquímicos como isoflavonas, fenólicos e saponinas, majoritariamente) (FRIEDMAN & BRANDON, 2001; CHEN *et al.*, 2012). A quantidade de tais componentes é variável, sendo dependente de fatores como condições climáticas e do solo onde o plantio é realizado (CHATTERJEE *et al.*, 2018).

As proteínas e seus compostos fitoquímicos associados, principalmente as isoflavonas, são os componentes da soja mais relacionados às suas propriedades bioativas, tais como atividades de auxílio na redução de risco de doenças cardiovasculares, hepáticas e relacionadas à perda de massa óssea, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (HSIEH & YANG, 2004; CHEN *et al.*, 2012; GUANG *et al.*, 2014).

O conteúdo proteico dos grãos de soja é de cerca de 35 a 40 % de seu peso seco, o qual é constituído por proteínas de armazenamento, tais como α -, β - e γ conglicininas, glicinina e outras globulinas, com diferentes propriedades físico-químicas. Destas, β -conglicinina (β CG, 7S – 360 kDa) e glicinina (11S – 150 kDa) são consideradas as principais proteínas de armazenamento, constituindo cerca de 80 a 90 % do conteúdo proteico total dos grãos de soja e possuindo todos os aminoácidos essenciais à saúde humana (ZARKADAS *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2008). β CG é composta por três subunidades (α' , α e β) e a glicinina possui subunidades ácidas e básicas, sendo que a variação de composição de suas subunidades está relacionada a diferenças em suas propriedades funcionais (WOLF, 1970; KILARA & HARWALKER, 1996; SITOBY *et al.*, 2012). As propriedades bioativas destas proteínas são relacionadas principalmente a seus peptídeos, inativos quando fazem parte da molécula original, e ativados quando submetidos à fermentação, processamento de alimentos e processos enzimáticos (SINGH *et al.*, 2014). Em estudo realizado por SITOBY e colaboradores (2011), β CG, glicinina e uma de suas subunidades básicas foram isoladas de grãos de soja e avaliadas quanto às suas propriedades antimicrobianas. As três frações apresentaram atividade contra bactérias patogênicas e contaminantes de alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella enteritidis*) na seguinte

ordem: subunidade básica > glicinina > β CG, nas concentrações de 50, 100 e 1000 μ g/mL, respectivamente, indicando maior atividade da subunidade isolada a partir da molécula original.

As isoflavonas são compostos que pertencem à classe dos flavonoides, sendo encontradas em grandes quantidades nos grãos de soja. Genisteína, daidzeína, gliciteína e seus respectivos glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina) são responsáveis por 50, 40 e 10 %, respectivamente, do conteúdo de isoflavonas nos grãos (CESAR *et al.*, 2007; MESSINA, 2016), e por suas propriedades bioativas. As isoflavonas são relacionadas principalmente às suas atividades antioxidante e antitumoral, porém estudos demonstram sua potencial utilização no controle de micro-organismos nocivos. Hong *et al.*, (2006) avaliaram as propriedades antimicrobianas da genisteína frente a bactérias patogênicas, incluindo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, encontrando resultados positivos tanto para bactérias susceptíveis quanto resistentes aos antimicrobianos. A gliceolina, sintetizada a partir da daidzeína, também apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* de acordo com estudo realizado por NG *et al.*, 2011.

Em estudo realizado por Ghahari *et al.* (2017), evidenciou-se atividade antimicrobiana de óleo essencial e extrato metanólico obtidos a partir de sementes de soja. Os materiais analisados continham alto teor de compostos alcaloides, flavonoides e fenólicos, com destaque para o carvacrol, identificado como composto majoritário. O carvacrol, classificado como um composto monoterpeneo fenólico, é descrito como um potencial agente antimicrobiano (NOSTRO & PAPALIA, 2012). Boia *et al.* (2013) analisaram a ação antibacteriana de extrato aquoso obtido a partir de resíduo sólido da soja. Observou-se ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, sendo os melhores resultados de inibição obtidos nestas últimas.

Assim, além do grão propriamente dito, produtos derivados da soja e resíduos resultantes de sua cadeia produtiva também podem apresentar composições ricas em moléculas bioativas, sendo importante a sua investigação.

1.1.1.1. Resíduos provenientes do processamento da soja

Resíduos agroindustriais são definidos como resultantes do processamento de produtos da agroindústria, podendo ser tanto de origem vegetal como animal (MUSSATO *et al.*, 2012). Estes resíduos são gerados em grande quantidade ao longo da cadeia produtiva de diversos produtos presentes no cotidiano e estão relacionados ao desperdício no uso de insumos e perdas entre produção e consumo. Além disso, resíduos agroindustriais podem possuir potencial nocivo tanto ao meio ambiente quanto a saúde humana e animal, devendo assim ser realizados tratamentos adequados antes de seu descarte, com consequente geração de custos adicionados ao valor final dos produtos (MAKRIS *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2011; MUSSATO *et al.*, 2012).

A reutilização de resíduos agroindustriais tem sido de grande interesse, visto que o volume gerado os torna uma significativa fonte renovável, além de possuírem composições químicas ricas em compostos com alto valor agregado (VANDAMME, 2009; MUSSATO *et al.*, 2012, LEMES *et al.*, 2016). Entre as potenciais aplicações de compostos provenientes de resíduos agroindustriais destacam-se a participação nas indústrias produtoras de energia, de biotecnologia, alimentícia e farmacêutica. Os resíduos agroindustriais podem se apresentar como fonte de moléculas bioativas, e estudos têm demonstrado que estas podem possuir propriedades importantes, incluindo antimicrobiana (MAKRIS *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2011; ROCHELLE, *et al.*, 2016; LEMES *et al.*, 2016).

Sendo uma das maiores culturas do mundo, a cadeia produtiva da soja é responsável por grande parte dos resíduos agroindustriais gerados mundialmente, e estes podem ser considerados uma fonte de baixo custo para processos industriais e aplicações biotecnológicas (LI *et al.*, 2013).

Ao longo da cadeia produtiva da soja, produtos secundários (grau B) são gerados a partir dos resíduos dos produtos primários (grau A) usualmente destinados ao consumo humano ou produção de combustíveis. Como exemplos de produtos secundários podem ser citados o (i) okara, obtido durante a produção do extrato aquoso de soja (“leite de soja”) e tofu, utilizado para alimentação e produção de ácidos orgânicos (BOWLES & DEMIATE, 2006; NIGAM, 2009); (ii) o farelo, resultante da extração do óleo de soja, posteriormente utilizado para produção de proteínas isoladas e texturizadas de soja (POTTER & HOTCHKISS, 1997) e (iii) o

melaço, resultante da extração do extrato proteico de soja, utilizado para produção de etanol (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013). Tais produtos, assim como seus produtos primários de origem, são reconhecidos por sua importância econômica.

Além destes produtos secundários, durante o processamento dos grãos de soja demais resíduos sem valor econômico aparente também são gerados, designados como produtos grau C, sendo utilizados como suplementação na alimentação animal e como substratos para compostagem (MUSSATO *et al.*, 2012), ou sendo simplesmente descartados. Porém, estudos demonstram que tais resíduos possuem elevado potencial biotecnológico devido às suas composições químicas ricas principalmente em proteínas, lipídeos, carboidratos totais e fibras. Entre estes resíduos encontram-se resíduos sólidos resultantes dos processos físicos prévios a extração do óleo de soja, como cascas, talos e fragmentos do grão. Estudos têm sugerido que esses resíduos sólidos podem ser utilizados como substratos para processos de fermentação, fontes de moléculas bioativas, produção de biocombustíveis e como bioadsorventes para remoção de metais pesados de sistemas hídricos (SILVA *et al.*, 2006; SUD *et al.*, 2008; MUSSATO *et al.*, 2012; NETO *et al.*, 2013; BLANES *et al.*, 2016).

Em estudo realizado por Tyug *et al.* (2010), foram analisados os conteúdos fenólicos e de isoflavonas isoladas, bem como as atividades antioxidantes, de dois produtos derivados do processamento da soja (pó da casca e pó do extrato aquoso de soja – produtos grau B) em comparação com um produto primário (pó do extrato aquoso de soja, comercializado como leite de soja em pó – grau A). Os resultados obtidos indicaram que os conteúdos de moléculas bioativas eram similares entre as três formas analisadas e que os produtos derivados possuíam propriedades antioxidantes similares ao produto primário, sendo interessante sua exploração futura no desenvolvimento de nutracêuticos. Tais resultados indicam que apesar de serem submetidos a diferentes processos exaustivos, os compostos responsáveis pela bioatividade dos grãos de soja estão ainda presentes nos resíduos e não perdem seu potencial biológico.

Freitas *et al.* (2018) realizaram estudo utilizando um dos principais subprodutos resultantes do processo de refino de soja para produção de óleos, a chamada “torta de soja” (*soymeal* em inglês). Tal resíduo foi submetido a processo de extração

utilizando-se água como solvente, gerando um extrato aquoso a ser utilizado para ensaios de avaliação de atividades biológicas, como antitumoral e antimicrobiana (em concentrações de 12,5 a 150 mg/mL, e de sua composição em relação aos grãos de soja propriamente ditos. O extrato apresentou atividade bactericida contra ampla gama de micro-organismos gram-positivos e gram-negativos e diversas classes de compostos fitoquímicos foram recuperados após a extração, sendo encontradas predominantemente isoflavonas, já reconhecidas por suas atividades antimicrobianas.

Apesar do aumento de estudos relacionados às potenciais atividades antimicrobianas de resíduos agroindustriais de forma geral, pesquisas relacionadas a novas alternativas de combate e controle microbiano ainda são muito escassas na literatura, principalmente relacionadas a resíduos de soja e biofilmes bacterianos.

1.2 Biofilmes bacterianos – aspectos gerais, problemática e estratégias de controle

1.2.1. Aspectos gerais de biofilmes bacterianos

Bactérias são consideradas micro-organismos ubiquitários, devido à sua capacidade de adaptação ambiental. Tal adaptabilidade se deve ao fato destes micro-organismos possuírem grande diversidade metabólica, o que possibilita que colonizem até mesmo ambientes com condições extremas onde outros seres vivos não sobreviveriam (MURRAY *et al.*, 2014). As células bacterianas podem ser encontradas em dois estados de vida básicos: como células planctônicas ou livres, ou como células sésseis, quando estão agrupadas, geralmente aderidas a uma superfície, ocorrendo então a formação de um biofilme. Biofilmes são definidos como comunidades microbianas onde as células se encontram envoltas por uma matriz de substâncias exopoliméricas, composta principalmente de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (LEWIS, 2001; FLEMMING & WINGENDER, 2010). A capacidade de formação de biofilme é um dos fatores de virulência mais importantes das bactérias, podendo sua formação ocorrer tanto nos

tecidos bióticos de hospedeiros animais e vegetais, quanto em superfícies abióticas, como metais, vidros e plásticos (DUNNE, 2002; LÓPEZ *et al.*, 2010).

As células bacterianas em biofilme apresentam perfis metabólicos e estruturais diferentes das células planctônicas, e podem ser consideradas como a forma mais comum de sobrevivência destas no meio ambiente por conferir maior resistência a condições de estresse. Os processos de formação e regulação dos biofilmes bacterianos são complexos e dependentes de diversos fatores, relacionados tanto ao meio ambiente quanto às células bacterianas (KUMAR *et al.*, 2017).

A formação de um biofilme bacteriano ocorre em quatro etapas fundamentais (figura 2): (a) adesão inicial à superfície, (b) desenvolvimento, (c) maturação e (d) dispersão (LEWIS, 2001; KUMAR *et al.*, 2017).

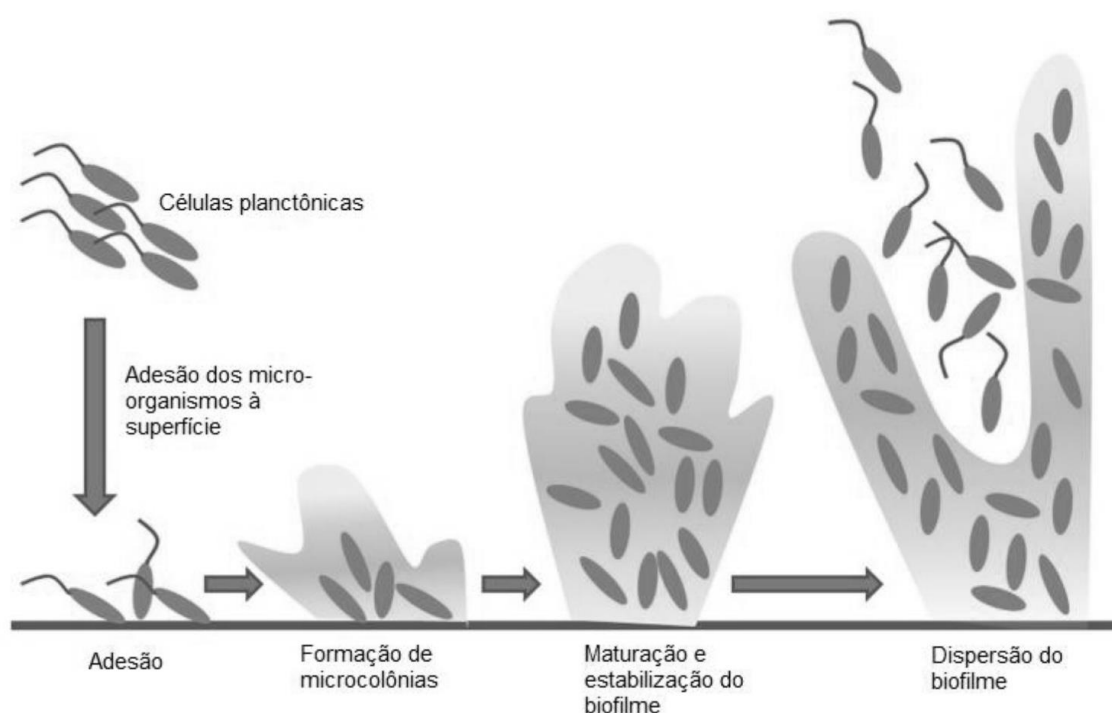


Figura 2. Etapas fundamentais da formação de biofilme (adaptado de GUPTA *et al.*, 2016).

A adesão inicial à superfície é o primeiro passo para a formação de um biofilme e nesta etapa o processo ainda é considerado reversível, visto que se as condições de colonização não se mostrarem favoráveis ao desenvolvimento da

comunidade microbiana, as células podem se dispersar e colonizar outros sítios (O'TOOLE *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2017). De forma geral, a adesão inicial às superfícies abióticas ocorre por meio de interações físico-químicas entre as células bacterianas e a superfície, sendo influenciadas pela topografia da superfície e por fatores relacionados às bactérias propriamente ditas, como presença e/ou produção de moléculas e estruturas de adesão (adesinas, *pili*, fímbrias, etc.) Já a adesão às superfícies bióticas ocorre por meio de interações moleculares, relacionadas a ligações do tipo receptor-ligante entre proteínas e/ou açúcares presentes na superfície das células do hospedeiro (DUNNE, 2002; ; KUMAR *et al.*, 2017).

As interações de natureza físico-química são principalmente as hidrofóbicas e eletroestáticas. Na superfície das diferentes células bacterianas existem números variáveis de sítios de ligação, nos quais múltiplas ligações de hidrogênio podem ser formadas com a superfície (figura 3) (CHEN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015).

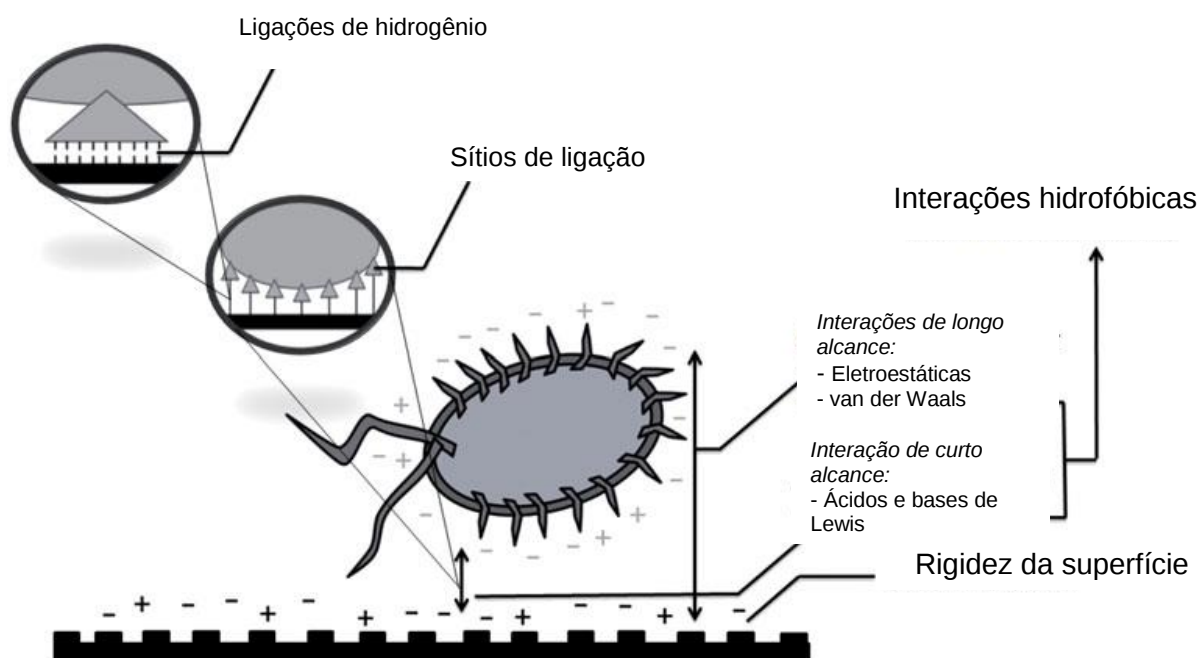


Figura 3. Fatores e interações físico-químicos (as) relacionados à adesão bacteriana em superfícies abióticas (adaptada de WANG *et al.*, 2015).

Tais interações podem ser afetadas pela hidrofobicidade da superfície da célula bacteriana (resultante da estrutura e composição bioquímica destas) (Van

der MEI *et al.*, 1987), pela hidrofobicidade da superfície do substrato (resultante da composição química do material e da rigidez da superfície) (QUIRYNEN *et al.*, 1990) e pela tensão superficial do meio líquido (van OSS *et al.*, 1986). De forma geral, estudos demonstram que a adesão ocorre mais fortemente em superfícies hidrofóbicas e apolares (JAMAL *et al.*, 2018).

As interações eletroestáticas são forças de longo alcance entre as células bacterianas e a superfície (figura 3) e podem ser afetadas pela carga da superfície celular (dependente da presença de um excesso de grupos carboxila e fosfato localizados na superfície celular) (GOULTER *et al.*, 2009), pela carga da superfície do substrato (dependente da natureza físico-química do material) (LI & LOGAN, 2004) e pela força iônica do meio líquido (BOS *et al.*, 1999).

Além disso, a composição das células bacterianas, que contém a presença de ácido teicoico, responsável pela carga negativa da parede celular, também deve ser levada em consideração quando se trata da atração entre célula e superfície (GROSS *et al.*, 2001).

Após a adesão inicial, as interações celulares com o meio, baseadas na densidade celular, têm papel essencial nos processos regulatórios do desenvolvimento de biofilmes a fim de tornar o processo irreversível, sendo os eventos de sinalização celular fundamentais para expressão de genes e produção de moléculas associados à sua formação. Sistemas de detecção para integração das respostas ambientais e sinalização celular podem induzir respostas de sistemas de dois componentes (TCS, do inglês *two-component systems*), de via de sinalização da função extracitoplasmática (ECF, do inglês *extracytoplasmatic function*) e de *quorum sensing* (QS) (MILLER & BASSLER, 2001; GUPTA *et al.*, 2016). Além dessas vias de regulação, moléculas que agem como segundas mensageiras intracelulares como c-di-GMP (do inglês *cyclic guanosine monophosphate*) também contribuem para o processo, estimulando e modulando diversas funções celulares (HENGGE, 2009).

Tais sistemas de regulação auxiliam então no início da etapa de desenvolvimento do biofilme, que consiste na formação de camadas de microcolônias e na produção da matriz exopolimérica. A formação de microcolônias implica na diminuição da motilidade celular, e por isso, podem ser consideradas

micro comunidades que agem de forma coordenada nas trocas com o meio, como distribuição e excreção de importantes produtos metabólicos durante o processo (JAMAL *et al.*, 2018). Estes produtos são reconhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS do inglês *extracellular polymeric substances*) sendo majoritariamente polissacarídeos e proteínas e têm como funções principais nutrição e proteção das microcolônias em desenvolvimento, formando uma camada denominada de matriz exopolissacarídica. Os componentes da matriz variam de acordo com a (s) espécie (s) envolvida (s) e o meio ambiente (LÓPEZ *et al.*, 2010) e estima-se que apenas cerca de 10 % do peso de um biofilme seja composto por micro-organismos formadores, enquanto os outros 90 % representam a matriz. Apesar de geralmente não serem referidos como estruturas rígidas, a mecânica estrutural dos biofilmes é de extrema importância, sendo o papel da matriz fundamental na estruturação de um biofilme durante seu desenvolvimento. Com a formação de multicamadas celulares, tais comunidades adquirem formato tridimensional semelhante à de um cogumelo e a matriz é responsável pela coesão desta estrutura, principalmente por suas propriedades adesivas e pela formação de canais que servem como distribuidores de nutrientes (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

Após a estabilização do biofilme no meio, os sistemas de regulação dão início à etapa de dispersão, onde as células que se encontram na camada mais superficial da estrutura passam a se desligar do biofilme maduro para retornarem ao estado planctônico e colonizar outros locais, iniciando um novo ciclo. A dispersão é coordenada pelo aumento na expressão de genes relacionados a fatores de motilidade ou a produção de enzimas líticas que agem diretamente na matriz (COSTERTON & STEWART, 1999; JAMAL *et al.*, 2018).

De forma geral, o sucesso de formação e desenvolvimento de um biofilme depende basicamente de três fatores: intrínsecos às bactérias (propensão à adesão por composição de sua superfície, presença de fatores de virulência que facilitem a adesão como fímbrias e presença de *pili*, produção de moléculas e regulação por *quorum sensing*), microambiente de desenvolvimento (pH, disponibilidade de nutrientes e temperatura) e propriedades da superfície, seja esta biótica ou abiótica (rugosidade, carga, hidrofobicidade e presença de moléculas propícias à ligações)

(DAROUICHE, 2001). Os processos envolvidos na manutenção desta forma de vida são bastante complexos e possuem como principal objetivo fazer com que as bactérias permaneçam o maior tempo possível em um sítio que forneça suporte à sua sobrevivência para dispersão e colonização de outros locais. Assim, biofilmes bacterianos são considerados um desafio em diversos setores, principalmente nos âmbitos clínico e industrial.

Como dito anteriormente, biofilmes são considerados estruturas resistentes que conferem maior persistência das células bacterianas em um ambiente favorável. A adaptação ao ambiente faz com que as células sésseis possuam diferenças em relação às células planctônicas, resultantes das interações físicas e sociais intra e interespecie que podem estar presentes na estrutura. Estas interações conferem às células sésseis propriedades estruturais e metabólicas diferenciadas, onde ocorre um aumento na troca de material genético e uma maior resistência a agentes físicos e químicos de desinfecção (LEWIS, 2001; FLEMMING *et al.*, 2016).

1.2.2. Biofilmes bacterianos – problemática e impacto econômico

Apesar de serem virtualmente encontrados em qualquer ambiente, os biofilmes bacterianos são relacionados principalmente à saúde humana, visto que cerca de 65 a 80 % das infecções crônicas ocorrem devido à sua formação (NIH, 2002; HØIBY, 2010; CORTES *et al.*, 2011). A tendência de cronificação de uma infecção relacionada a um biofilme ocorre devido a diversos fatores, principalmente pela maior resistência aos antimicrobianos (células sésseis podem ser de dez a mil vezes mais resistentes que células planctônicas) (LEWIS, 2001; DAVIES, 2003) e ao escape do sistema imune do hospedeiro, devido a sua estruturação e proteção pela matriz (que dificulta o reconhecimento das superfícies celulares e impede a ligação de moléculas de defesa produzidas pelo sistema imune) (GUPTA *et al.*, 2016; WATTERS *et al.*, 2016). As infecções relacionadas aos biofilmes bacterianos podem ser divididas em duas grandes categorias: infecções devido ao uso de dispositivos médicos invasivos e infecções prévias ou inerentes aos tecidos do hospedeiro (SUN *et al.*, 2013).

Dispositivos médicos invasivos (DMI) são definidos como qualquer material inserido no corpo humano que de acordo com o fabricante deva ser utilizado sozinho ou em combinação, para qualquer uma das seguintes funções: diagnóstico e/ou prevenção de doenças, tratamento ou alívio de doenças já existentes, suporte ou sustentação à vida, controle de concepção e de modificação ou suporte da anatomia ou de um processo fisiológico (SHAH & GOYAL, 2008). Os exemplos mais comuns de DMI utilizados incluem cateteres de acesso venoso e urinários, válvulas cardíacas mecânicas, próteses ortopédicas, marca-passos cardíacos e tubos endotraqueais, sendo aparatos de extrema importância principalmente em unidades de tratamento intensivo (UTIs) (SUN *et al.*, 2013; ARCIOLA *et al.*, 2018). Os DMI têm sido muito utilizados pela medicina atualmente e se mostram como opções de auxílio no aumento da expectativa e qualidade da vida humana, porém oferecem maior risco associado de desenvolvimento de infecções bacterianas, sendo classificadas dentro do grande grupo de infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS). O desenvolvimento de infecções bacterianas associadas ao uso de DMI é dependente de dois fatores principais, sendo eles o tempo de utilização de tal aparato e do grau de comprometimento do sistema imune do paciente, havendo relação direta entre aumento do tempo e diminuição da capacidade imune com o aumento da chance de desenvolvimento de infecção (PERCIVAL *et al.*, 2015).

As principais infecções associadas a DMI são infecções respiratórias, cardíacas, urinárias e ósseas, e juntas são responsáveis por cerca de 94 milhões de dólares, gastos com tratamento de infecções crônicas nos Estados Unidos da América por ano (RÖMLING *et al.*, 2014). Considerando-se a taxa de probabilidade de um paciente com utilização de DMI desenvolver uma infecção crônica, pode-se prever que os gastos iniciais do seu tratamento podem se elevar a quase sete vezes quando o processo infeccioso ocorre de fato (MAHAMI & ADU-GYAMFI, 2011). De acordo com levantamentos descritos na literatura, os gastos totais com tratamentos de infecções crônicas são relacionados ao prolongamento da terapia com antimicrobianos, tempo de internação e cuidados associados e à realização de procedimentos cirúrgicos para retirada do DMI, o que acarreta também em maior

desconforto dos pacientes, podendo aumentar também as taxas de morbidade e mortalidade (HØIBY *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015).

As demais infecções associadas a biofilmes bacterianos são aquelas que não dependem da inserção de um biomaterial visto como corpo estranho, mas que ocorrem devido a um *déficit* imunológico do organismo que propicia o desenvolvimento da infecção. Geralmente causadas por micro-organismos oportunistas, tais infecções podem ocorrer devido à colonização por deslocamento para sítios do corpo humano normalmente estéreis ou em tecidos que já possuam microbiota, mas que devido ao *déficit* imunológico ou quebra de barreiras de defesa naturais, como a pele, facilitem o desenvolvimento do processo infeccioso (BURMOLLE *et al.*, 2010; WATTERS *et al.*, 2016). Dentre estas infecções as mais comuns são otite, rino-sinusite, periodontite, osteomielite, infecções em feridas operatórias e infecções urinárias no geral (SUN *et al.*, 2013). Infecções respiratórias causadas por biofilmes bacterianos também são muito comuns e associadas a pacientes com fibrose cística, condição genética na qual ocorre a diminuição da produção do fluido para ciliar, com acúmulo de muco e secreções pulmonares que facilitam a formação de agregados bacterianos (HØIBY, 2017).

Além do âmbito clínico, outros setores também são alvo de biofilmes bacterianos. A contaminação bacteriana na água, levando a formação de biofilmes em sistemas hídricos, é um dos principais problemas industriais associados a bactérias. Bioincrustação, contaminação de água e alimentos destinados ao consumo humano, mal funcionamento de equipamentos por obstrução e corrosão de materiais são alguns dos problemas ocasionados por biofilmes nas indústrias (MATTILA-SANDHOLM & WIRTANEN, 1992; VELMOUROUGANE *et al.*, 2017; GALIÉ *et al.*, 2018). Além disso, grande parte das bactérias contaminantes de sistemas industriais, principalmente através da água, são patógenos antropofílicos oriundos diretamente de resíduos gerados pelo homem, biológicos ou relacionados a estes, e podem acarretar no aumento da resistência a antimicrobianos e a agentes de desinfecção durante seu fluxo de descarte (VELMOUROUGANE *et al.*, 2017). Nos setores industriais, estima-se que a formação de biofilmes seja responsável por diminuir em cerca de 40 % a efetividade de processos e

funcionamento de equipamentos, com consequente aumento de gastos e perdas de produção (NYA, 2015).

Assim, reconhecidos por serem desafios em diversos setores, os biofilmes bacterianos têm sido cada vez mais objeto de pesquisas relacionadas a estratégias de controle e/ou combate, que podem ser aplicadas em suas diferentes etapas de desenvolvimento.

1.2.3. Estratégias de controle e combate a biofilmes bacterianos

Devido à sua importância nos setores clínico e industrial, a busca por estratégias de combate e controle de biofilmes bacterianos tem sido amplamente difundida entre diversas áreas do conhecimento. Tais estratégias podem ser aplicadas durante qualquer uma das etapas de desenvolvimento de um biofilme, buscando principalmente inibir a sua formação ou erradicar um biofilme já formado (TRENTIN *et al.*, 2013). O controle ou combate aos biofilmes pode implicar na aplicação de métodos físicos, biológicos e/ou químicos.

Métodos físicos podem incluir aqueles capazes de danificar ou romper a estrutura tridimensional através de forças mecânicas. Estes métodos incluiriam procedimentos para desinfecção e esterilização dos locais de adesão, podendo romper o biofilme, mas não necessariamente conseguir eliminar todas as células viáveis, que podem se dispersar e iniciar o ciclo novamente. Além disso, tais processos são de acesso facilitado no âmbito clínico, principalmente na prevenção da formação de biofilmes, devido ao tamanho reduzido das superfícies abióticas, mas tornam-se mais difíceis nos setores industriais, onde o tamanho dos equipamentos, principalmente hídricos que são sistemas fechados, não possibilita o acesso tão facilmente (MATTILA-SANDHOLM & WIRTANEN, 1992).

Os métodos biológicos incluem a utilização de outros micro-organismos e de anticorpos. Nesta linha, os estudos que utilizam bacteriófagos ou simplesmente fagos, partículas virais que infectam bactérias, são os mais comuns. O fago pode se ligar a diversas estruturas e moléculas presentes na superfície das células bacterianas, sendo a sua especificidade de infecção uma de suas maiores vantagens. Porém, a especificidade perde sua eficiência quando as células já se

encontram em biofilme, visto que o fago não consegue se ligar às células presentes nas camadas mais profundas da estrutura, tornando a erradicação do biofilme quase impossível, sendo portanto, mais eficaz na prevenção de sua formação (CORTÉS *et al.*, 2011; PIRES *et al.*, 2017).

Os métodos químicos são os mais utilizados nos estudos em relação aos biofilmes. Neste grupo, são encontradas estratégias que incluem desenvolvimento de novos compostos ou moléculas, bem como a modificação de estruturas já conhecidas. As estratégias químicas de controle e combate a biofilmes bacterianos são em sua maioria voltadas a inibição da formação deste, visto que a erradicação de um biofilme já formado é mais difícil, pois tal estrutura é resistente física e quimicamente a maior parte dos agentes empregados atualmente. A utilização de compostos químicos, sejam eles de origem natural ou sintética, pode ser ampla, visto que devido às ligações e alterações bioquímicas que estes podem causar nas células bacterianas, seus mecanismos e vias de ação são diversos. Estes podem agir em qualquer etapa da formação de um biofilme bacteriano, como pelo bloqueio de sítios moleculares que facilitam a adesão (alteração na produção de adesinas e expressão de genes relacionados à estruturas físicas de adesão, alteração nos sistemas de comunicação celular), agindo na produção ou dispersão da matriz exopolissacarídica (alterações estruturais e bioquímicas que acarretam na má formação ou rompimento) e na dispersão (indução de dispersão para acesso dos compostos às camadas mais profundas da estrutura) (CORTÉS *et al.*, 2011; KOO *et al.*, 2017).

Tais terapias possuem risco associado de desenvolvimento de resistência, e o tratamento de infecções bacterianas tem-se tornado um desafio cada vez maior devido às altas taxas de resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado (WRIGHT, 2013). A busca por alternativas levou ao surgimento do conceito de terapias antivirulência, ou seja, terapias que consistem na modulação dos fatores de virulência bacterianos, tais como a formação de biofilme, agindo em aspectos como expressão e função destes, ao contrário dos antimicrobianos convencionais que agem diretamente em processos essenciais às células bacterianas (CLATWORTHY *et al.*, 2007), diminuindo assim a pressão seletiva imposta às células. De forma geral, as principais terapias antivirulência podem ser classificadas

conjuntamente dentro dos métodos biológicos e/ou químicos, sendo as moléculas com capacidade de inibir a formação de biofilme classificadas dentro deste grupo.

1.3 *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis* são cocos gram-positivos comensais da microbiota humana que podem apresentar potencial patogênico, sendo patógenos oportunistas. Ambas as espécies podem apresentar mecanismos intrínsecos ou adquiridos de resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência importantes, tais como a formação de biofilmes (MURRAY *et al.*, 2014).

Staphylococcus aureus é encontrado colonizando principalmente a nasofaringe de aproximadamente 20 a 25 % dos indivíduos hígidos de forma persistente e em 60% da população de forma intermitente (DELEO *et al.*, 2010; JENKINS *et al.*, 2015). Outros sítios, em menor frequência, também são colonizados por *S. aureus*, tais como pele, trato gastrointestinal e região do períneo (WERTHEIM *et al.*, 2005). As infecções agudas causadas por esta bactéria incluem infecções de pele e de tecidos moles e bacteremia, geralmente causadas por células planctônicas através da secreção de enzimas e exotoxinas (GORDON & LOWY, 2008). Já as infecções crônicas são associadas principalmente a formação de biofilme, incluindo osteomielite, endocardite e quadros associados ao uso de DMI (KIEDROWSKI & HORSWILL, 2011).

Staphylococcus epidermidis faz parte do grupo de *Staphylococcus* coagulase negativos (CoNS), pela ausência da enzima coagulase, considerado a espécie de maior importância clínica dentro do grupo (MURRAY *et al.*, 2014). É um micro-organismo tipicamente encontrado na pele humana, estando seus quadros infecciosos associados primariamente à quebra da barreira cutânea. A maior parte das infecções por *S. epidermidis* são causadas por formação de biofilmes em DMI, principalmente em cateteres (OTTO, 2009).

1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo adaptado às mais diversas condições ambientais, sendo encontrado principalmente em água e solos.

Em humanos está associado a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), principalmente infecções de feridas e queimaduras; bacteremias e infecções urinárias causadas pelo uso de DMI (STRYJEWSKY & SEXTON, 2003), sendo também a principal causa de infecções crônicas pulmonares em pacientes com fibrose cística (LYCZAK *et al.*, 2002). A importância de estratégias de combate à formação e erradicação de biofilmes em *P. aeruginosa* se estende também aos setores industriais, onde esta se apresenta como um dos principais microrganismos contaminantes de produtos e causadores de mau funcionamento de estruturas e equipamentos (MATTILA-SANDHOLM & WIRTANEN, 1992; SREY *et al.*, 2013).

1.5 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental no estudo de biofilmes

Estudos *in vivo* têm sido muito utilizados para complementar os dados de estudos *in vitro* em relação aos biofilmes microbianos e também na avaliação de desempenho de possíveis estratégias de combate e controle, visto que permitem avaliação de seus processos nas condições reais de um hospedeiro (LEBEAUX *et al.*, 2013).

O uso de animais vertebrados é fortemente relacionado a questões éticas, sendo os modelos invertebrados alternativas para estudos de interações patógeno hospedeiro e respostas imunes (LEMAITRE & AUSUBEL, 2008). *Caenorhabditis elegans* (figura 4) é um nematódeo de vida livre que apresenta diversas vantagens como modelo experimental, tais como facilidade de cultivo, reprodução e manutenção (SIFRI *et al.*, 2005). Primariamente utilizado em estudos de desenvolvimento, neurobiologia e envelhecimento, *C. elegans* também é descrito como modelo experimental em estudos relacionados à patogênese bacteriana e a formação de biofilmes, podendo ser infectado por uma ampla variedade de bactérias (DARBY *et al.*, 2002; KALETTA & HENGARTNER, 2006; DIARD *et al.*, 2007).



Figura 4. *Caenorhabditis elegans* em microscopia com contraste de interferência diferencial (barra de escala 0.1 mm) (adaptado de <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>).

A maior parte dos estudos com a utilização de *C. elegans* para avaliação de biofilmes envolve a alimentação do nematódeo com cepas de interesse e monitorização de sua sobrevivência ao longo do tempo, sendo este um procedimento de fácil execução (SIFRI *et al.*, 2005). Quando alimentado normalmente com a cepa laboratorial *Escherichia coli* OP50, *C. elegans* apresenta período aproximado de duas semanas de vida e nos ensaios onde sua alimentação é substituída por cepas patogênicas observou-se diminuição significativa deste período, ocorrendo em alguns casos, a morte em três horas após a infecção (PARK *et al.*, 2017). Outra vantagem em relação a tal modelo e seu método de utilização mais comum (alimentação) é a possibilidade de se avaliar não somente a patogênese bacteriana, mas também a toxicidade de compostos e/ou moléculas ativas.

O estudo de biofilmes em modelos *in vivo* tem sido amplamente difundido e a comprovação de que a maior parte dos mecanismos necessários para o desenvolvimento de biofilmes em humanos e em *C. elegans* se mantém, o torna um modelo de hospedeiro alternativo interessante no estudo de biofilmes microbianos (KALETTA & HENGARTNER, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a potencial ação antibiofilme e antimicrobiana de extratos obtidos de resíduos provenientes do processamento da soja.

2.2 Objetivos específicos

- a) Obter extratos brutos a partir de resíduos provenientes do processamento da soja;
- b) Avaliar as atividades antibiofilme e antimicrobiana dos extratos brutos;
- c) Fracionar o extrato com melhor atividade antibiofilme e caracterizá-lo quimicamente;
- d) Avaliar potenciais vias de ação do extrato mais ativo;
- e) Avaliar a toxicidade do extrato em modelo de *Caenorhabditis elegans*.

3. RESULTADOS

Conforme as normas vigentes para elaboração de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, os resultados obtidos no presente estudo serão apresentados a seguir em formato de manuscrito de artigo científico redigido em inglês, de acordo com as orientações disponibilizadas pela publicação de escolha dos autores.

TÍTULO DO ARTIGO:

Soybeans agroindustrial residues as staphylococcal biofilm inhibitors

PERIÓDICO ESCOLHIDO PARA SUBMISSÃO:

Industrial Crops and Products

ÍNDICE DE IMPACTO (2018):

3,84

QUALIS CAPES (Ciências Biológicas I/III):

B1

NORMAS PARA SUBMISSÃO:

O seguinte manuscrito foi redigido de acordo com as orientações e normas disponibilizadas pelo periódico de escolha para a categoria de artigos originais de pesquisa, disponíveis no seguinte endereço:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/522825?generatepdf=true

Soybeans agroindustrial residues as staphylococcal biofilm inhibitors

Francine dos Santos Ramos ¹; Derik Midon Martins ²; João Pedro Nunes Sagini ²; Isabelle Coutinho dos Santos ²; Jéssica Tostes ²; Adriana Seixas ³; Caroline Brandão Quines ⁴; Flávia Suelen de Oliveira Pereira ⁴; Daiana Ávila ⁴; Aline Rigon Zimmer ⁵; Karine Rigon Zimmer ^{1, *}

¹ Programa de Pós-graduação em Biociências, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

² Curso de Biomedicina, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Programa de Pós-graduação em Biociências, Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Laboratório de Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBTOXce), Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS 97500-970, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

E-mail adress: karinerz@ufcspa.edu.br (K.R. Zimmer)

Abstract

The reuse of agroindustrial waste has been the subject of several researches, since since they have a rich chemical composition, their disposal generates costs to the industries and potential harmful to the environment. Among these residues stand out these from soybeans, a grain with proven beneficial activities to human health. The search for active compounds against biofilms, which are defined as microbial communities attached to surfaces, has been extremely important, since they are challenges in clinical and industrial environments. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential antibiofilm and antimicrobial activities of extracts obtained from soybeans processing residues in the following bacteria *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The residues used were subjected to an ultrasonic extraction process, using water as solvent. The antibacterial and antibiofilm activities of two crude extracts were evaluated using absorbance (620 nm), UFC counting and the crystal violet method. The extract obtained from fragments of the grain and stalks (E1) presented major antibiofilm activity, being chosen for chemical characterization using thin layer chromatography and colorimetric methods, thermal and enzymatic treatments, fractionation in column chromatography (CC - size exclusion chromatography) and ultracentrifugation processes. E1 (4 mg/mL) inhibited in 75% the formation of *S. epidermidis* biofilm without inhibition of growth. Chemical characterization showed the presence of amino acids, saponins, terpenes and steroids. Antibiofilm activity of E1 was lost when it was submitted to heat treatment while the enzymatic treatment led to the loss of 30% in the activity of the extract, suggesting that the antibiofilm molecules may be of protein origin. Two fractions obtained from CC were able to inhibit by approximately 35% the biofilm formation of *S. epidermidis*. From the ultracentrifugation process, antibiofilm activity was observed only when two fractions (fraction > 50 kDa and fraction <10 kDa) were combined, suggesting that the biological activity is dependent on the synergism of the active molecules. Our results demonstrated that the antibiofilm effect is achieved with just 6 h of treatment with E1 and suggests that the biological activity is via physical effect, since its antibiofilm activity is observed only when in direct contact with bacterial cells. In addition, acute treatment with E1 extract did not cause any toxic signs in *Caenorhabditis elegans*, however chronic exposure caused reduced worms survival, increased body length and increased GST-4 expression. This work shows that soybeans agroindustrial residues may be a potential source of molecules with activity against bacterial biofilms and with low toxicity *in vivo*, which can be managed by the concentration used.

Keywords: soybeans; agroindustrial residues; antibiofilm; *S. aureus*; *S. epidermidis*

1. Introduction

Agroindustrial residues are defined as the resulting products of the processing of agroindustry, being produced in large quantities from the productive chain of various products that are present in daily life mainly of animal and vegetable origins (Mussato et al., 2012). This residue may present a harmful potential to both environment and animal health and in order to minimize possible contaminations some chemical previous treatments must be applied before its discard, which aggregates costs to the final value of the products (Makris et al., 2007; Rosa et al., 2011; Mussato et al., 2012).

Based on the large amount of agroindustrial waste produced worldwide, the reuse of this raw material has become of great interest due to its rich chemical compositions and the possibility of being applied as a new type of renewable source (Vandamme, 2009; Mussato et al., 2012, Lemes et al., 2016). Some studies that have reported that they contain many bioactive molecules with important biological properties such as antioxidant, antitumoral, anti-inflammatory and antimicrobial (Makris et al., 2007; Melo et al., 2011; Rochelle, et al., 2016; Lemes et al., 2016).

Soybeans (*Glycine max*) and its derivative products are among the most consumed products worldwide mostly to human and animal consumption and biofuel production (Li et al., 2013). Due to its high protein and low fat content, soybeans are known as a functional food and previous studies have shown its many beneficial properties to human health. Some of these studies have shown that soybeans, its derivatives and residues products also may present important

biological properties such as antioxidant and antimicrobial (Hsieh & Yang, 2004; Chen et al., 2012; Guang et al., 2014).

Biofilms are microbial communities living attached to a biotic or abiotic surface involved by a polymeric extracellular matrix composed basically of polysaccharides, proteins and extracellular DNA (Lewis, 2001; Flemming & Wingender, 2010). Bacterial cells in sessile form are more resistant to antimicrobials, chemical and physical disinfection agents and to host immune defenses being responsible for therapeutic failures and industrial large contaminations (Lewis, 2001; Srey et al., 2013). Some bacterial species of clinical and industrial interest are biofilm producers such as *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (Von Borowski et al., 2019).

In order to enable the application of compounds presenting biological activity, their safety must be addressed. One model that has been used to this end is the nematode *Caenorhabditis elegans*, ideal for (eco)toxicogenomics studies to assess the testing of chemicals, technical materials, and environmental risk assessment (Abbas et al., 2018, Han et al., 2018, Tejeda-Benitez et al., 2018). Furthermore, *C. elegans* is sensitive to residual toxicity, which makes this model appropriate to monitor and evaluate agroindustrial residues (Abbas et al. 2018; Han et al. 2018; Tejeda-Benitez et al. 2018).

The aim of this study was to evaluate antimicrobial and antibiofilm activities of aqueous crude extracts obtained from soybeans agroindustrial residues and to investigate the nature, the possible path of action of antibiofilm compounds and safety of the most active extract using the alternative model *C. elegans*.

2. Materials and methods

2.1 Agroindustrial residues and extraction

Soybeans agroindustrial residues were kindly given by Bianchini S.A company (Canoas, RS, Brazil). Two types of residues were collected being nominated as residue 1 (R1) composed by grains fragments and stalks and residue 2 (R2) composed only by soybeans husks. R1 and R2 were processed in a knife mill and stored at – 20°C until use. Aqueous crude extracts were obtained according to the extraction protocol suggested by Oniszczuk et al. (2014). Briefly, 20 mL of sterile distilled water were added to 2 grams of both R1 and R2 and submitted to ultrasound at 60 °C for 30 min and the supernatant was collected and transferred to a new recipient. This process was repeated three times. Two extracts were obtained named as E1 from R1 and E2 from R2 and they were submitted to lyophilization and subsequently stored at – 20°C. For further assays lyophilized extracts were directly dissolved in distilled water and filtered through a 0.22 µm pore membrane.

2.2 Bacterial strains and growth conditions

Staphylococcus epidermidis ATCC 35984, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas aeruginosa* PA14 were grown in tryptic soy agar (TSA) overnight at 37°C. A bacterial suspension in 0.9% sterile NaCl solution, equivalent to 10⁸ CFU/mL (OD = 0.150 ± 0.05 in 620 nm) was used in the assays.

2.3 Microbiological assays

2.3.1 Antibiofilm and antimicrobial assays

Biofilm assays were performed using the violet crystal method (CV) as described by Trentin et al. (2011) with minor modifications. In the biofilm formation inhibition assay, 40 μ L of tryptic soy broth (TSB), 80 μ L of extract E1 or E2 (with a final concentration of 4 mg/mL for both extracts) and 80 μ L of bacterial suspension were added to 96 well polystyrene flat bottom microtiter plates (KASVI®) followed by an incubation period of 24 hours at 37°C. For biofilm eradication assay, 100 μ L of bacterial suspension and 100 μ L of TSB were added to the plates and incubated in order to allow a preformed biofilm. After incubation period, plates content was discarded and wells were washed three times with a 0.9% sterile NaCl solution and filled with 100 μ L of TSB and 100 μ L of extract E1 or E2 and incubated for more 24 hours at 37°C. Following the incubation time in both assays, the content of the plate was discarded and wells were washed three times with sterile saline solution. Remaining attached bacteria were heat-fixed at 60°C for 1 hour. The adherent biofilm layer formed was stained with 200 μ L of 0.4% crystal violet for 15 min. at room temperature. Excess stain was removed by placing plates under running tap water until the flowing water appeared colorless. The dye bound to the cells was solubilized with methanol and the absorbance was measured (570 nm). Negative control (untreated) was prepared by replacing the extracts for sterile distilled water. Rifampicin and gentamicin (8 μ g/mL) were used as bacterial growth control for staphylococcal species and for *P. aeruginosa*, respectively.

Antimicrobial activity was evaluated during the antibiofilm assay, based on the difference between initial ($t = 0$) and final ($t = 24$) absorbances at 620 nm of the plates content previous its discard (Zimmer et al., 2013). To corroborate the absorbance readings, aliquots of the wells previously treated with extract (E1)

were diluted serially and spread on TSA plates and incubated for 24 hours at 37°C to CFU determination.

2.3.2 Biofilm assay with variable exposure time

The antibiofilm action of E1 was evaluated against *S. epidermidis* biofilm as described in item 2.3.1 using six different periods of incubation (2, 4, 6, 8, 16 and 24 h).

2.3.3 Dose-response assay

The biofilm formation and bacterial growth were evaluated as mentioned in item 2.3.1 in a dose response assay varying the concentration of E1 (0.25; 0.5; 1; 2; and 4 mg/mL).

2.3.4 Determination of extract effect on biofilm formation (recovery assay)

In order to determine if E1 had a reversible or irreversible effect on *S. epidermidis* biofilm, the CV method was followed with a slight modification (Zimmer et al., 2013). A first assay was conducted following the same steps already described in section 2.3.1 but previously to wash steps, the liquid content of the wells was gently collected and added to microtubes and submitted to three washing cycles with sterile saline solution using centrifugation at 5000 rpm for 15 min each. The free-treatment cells pellet obtained was then suspended in saline solution and adjusted to an $OD=0.150 \pm 0.05$ (OD_{620} nm) and used as a new bacterial suspension in a second biofilm formation assay as described in section 2.3.1.

2.3.5 Cell surface hydrophobicity (CHS)

To evaluate the effect of E1 on bacterial cell surface hydrophobicity (CHS) a protocol proposed by Limsuwan and Voravuthikunchai (2008) was used. Bacterial cells (2 mL) were cultivated in TSB broth (1 mL) in the presence of the E1 (2 mL; 4 mg/mL) for 24 hours. After incubation time, bacteria cells were collected by centrifugation and washed three times with a 0.85 % sterile NaCl solution. Afterwards, the final pellet was suspended in saline solution (0.85%) to obtain an OD₆₀₀ of 0.4 (OD initial). Three milliliters of this suspension were placed to glass tubes and 250 µL of toluene were added. The toluene phase was separated from the aqueous phase, and the OD was determined spectrophotometrically at 600 nm (OD final). The control consisted of bacterial cells incubated with Milli-Q water. The hydrophobicity index (HI) was determined as $[(\text{OD initial} - \text{OD final}) / \text{OD initial}] \times 100\%$.

2.4 Extract chemical characterization

2.4.1 Thin layer chromatography (TLC)

E1 was subjected to TLC using silica gel plates (Kieselgel 60 F254 0.2 mm, Merck, Germany) and the following systems as eluents: chloroform, methanol, water and acetic acid (30:17:2:0.2 v/v) and butanol, acetic acid and water (70:20:10 v/v). The TLC plates were observed under 254 and 365 nm UV light (Handheld UV Lamp Model 9403E, BioAmerica Inc., USA). Ninhydrin was used for amines and amino acids detection and sulfuric anisaldehyde, for the detection of steroids and terpenes.

2.4.2 Determination of total protein content

Total protein content of E1 was determined using the Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit according to the manufacturer's instructions and the results were expressed as mg/mL of total protein content. Bovine serum albumin (BSA) was used as standard.

2.4.3 Determination of total phenolic content

The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method, according to the previous studies of Zimmer et al. (2012). The sample (E1) was dissolved in methanol (1.0 mg/mL solution), gallic acid was used as standard to obtain the calibration curve. Results were expressed in micrograms of gallic acid equivalents per milliliters of extract (µg/mL).

2.4.4 Determination of total flavonoids content

The total flavonoids content was measured according to the methodology proposed by Chang et al. (2002). The sample (E1) was dissolved in methanol (1.0 mg/mL) and then 10% aluminum chloride solution 1M sodium acetate was added. The absorbance at 415 nm was determined after 30 min. Quercetin was used as standard to obtain the calibration. Curve and the results were expressed as micrograms of quercetin equivalents per milliliters of extract (µg/mL).

2.4.5 Determination of tannins content

The condensed tannins content was determined by the Vanillin reaction described by Price (1978) using a 1% methanolic vanillin solution and 8% HCl (in methanol). The samples were placed in water bath at 30°C for 20 min, and the

absorbance was determined at 500 nm. Catechin was used as standard to obtain the calibration curve and the results were expressed as micrograms of catechin equivalents per milliliters of extract ($\mu\text{g/mL}$).

The hydrolysable tannins content was estimated using the potassium iodate method. Briefly, to the E1 extract was added 2.5% potassium iodate solution with stirring, the mixture was kept in a water bath at 25°C for 35 min, and the absorbance was measured at 550 nm. Tannic acid was used as standard to obtain the calibration curve and the results were expressed as micrograms of tannic acid equivalents per milliliters of extract ($\mu\text{g/mL}$).

2.4.6 Thermal and enzymatic treatments

E1 was subjected to thermal and enzymatic treatments and then had its antibiofilm and antimicrobial activities evaluated as mentioned in section 2.3.1. The thermal treatment consisted in boiling the extract using a dry bath at 100°C for 10 min. For the enzymatic treatment, active and inactive forms of proteinase K (100 μg) were added to E1 independently. Proteinase K inactivation was achieved using a 10 min. boiling period at dry bath.

2.5 E1 fractionation

2.5.1 Column chromatography (CC – gel filtration column)

E1 was applied onto a *gel filtration column* (Sephadex™ LH-20, Sigma-Aldrich). A total of 24.84 grams of Sephadex LH-20 silica was weighed and 502.0 mg of the active extract powder were applied after column mounting and water was used as mobile phase. The eluate was collected in glass vials with a 10 mL capacity generating a total of forty fractions. Afterwards, vials content was freezer

stored until lyophilization moment. For further microbiological assays the lyophilized fractions were directly dissolved in distilled water at a concentration of 10 mg/mL (concentration final of 4 mg/mL in wells) and filtered through a 0.22 µm pore membrane.

2.5.2 Ultrafiltration assays

First, E1 was fractionated using ultra centrifugal filters (Amicon™ Merck Millipore, County Cork, Ireland) with different cutoff ranges (10 kDa, 30 kDa and 50 kDa) and the fractions obtained (filtrate and non-filtrate) were tested for antibiofilm and antibacterial activities as mentioned in item 2.3.1. In a second moment, fractions were submitted to exhaustive fractioning in order to obtain samples within the delimited ranges. The fractions were filtered through a 0.22 µm pore membrane and freezer stored until use.

2.6 Polyacrylamide gel electrophoresis

Samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under denaturing conditions (Laemmli 1970) and stained with Coomassie Brilliant Blue and silver nitrate. Electrophoresis was performed using a Mini-PROTEAN Tetra cell system (Bio-Rad) and stacking and resolving gels were 5% and 15% polyacrylamide, respectively.

2.7 Caenorhabditis elegans assays

2.7.1. C .elegans strains maintenance and treatments

The strains used in this study were Bristol wild type (N2) and CL2166 [(pAF15) *gst-4p::GFP::NLS*], which were obtained from Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota).

Strains were maintained at 20°C in NGM (Nematode Growth Medium) plates containing a lawn of *Escherichia coli* OP50. The animals that were submitted to treatment with E1 were at the same larval stage and to obtain them we synchronized adult worms. Gravid adult hermaphrodites were lysed by using a bleaching solution (NaOH 1M, NaClO 1%) to break their cuticle and to release the eggs. After approximately 12-14 hours, the eggs hatched, releasing the L1 larvae, which were used in the experiments.

For the treatments, the L1 population was submitted to acute or chronic protocols of treatment with E1 at two concentrations: 2 mg/mL and 4 mg/mL. In the acute treatment 1,500 worms were exposed to these concentrations during 30 minutes. After, these animals were washed three times with M9 to remove the extract and then worms were transferred to plates with *E. coli* OP50 as food source.

In the chronic exposure, 50 L1 worms were submitted to extract treatment at different concentrations for 24 h in a 24-wells plate under orbital stirring. During the first hour, the worms remained without food, after this period 5 µL of *E. coli* OP50 was added as food source. After 24h treatment, the worms were transferred to plates with NGM and *E. coli* OP50.

2.7.2 Survival assay

This assay was performed to evaluate the effects of extract in the worms survival rate. After a recovery period of 48 h of both treatments (acute or chronic)

we evaluated the number of alive worms N2 on the plates. This result was expressed as percentage of control and the assay was conducted in duplicate. Furthermore, this experiment has been repeated at least 3 times.

2.7.3 Body length

In order to evaluate worms development, after the 48h recovery period animals were transferred to microscope slides (containing levamisole 1 mM) and then images were acquired using an inverted microscope (MEDILUX MDL-INV-1) connected to a digital camera (SAMSUNG ST64). The body length of 10 worms per group was measured using the ImageJ software. The experiments were performed in triplicates. The results were expressed as % of control.

2.7.4 Brood size measurements

The nematodes were treated (acute or chronic) as described above and were maintained on NGM/OP50 plates until they reached larval stage L4 (48h). To evaluate brood size, one nematode from each treatment was transferred to a new plate containing NGM medium, and the total number of progeny was counted until the end of the reproductive period (Guo et al., 2009). The experiments were performed in triplicates. The results were expressed as % of control.

2.7.5 GST-4 expression

The strain CL2166 [(pAF15) *gst-4p::GFP::NLS*] emits fluorescence when the Glutathione S-transferase (GST) promoter is transcript. The intensity of green fluorescence protein (GFP) is proportional to the expression of GST-4. After 48h of treatments (acute and chronic) the fluorescence intensity was observed in an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse 50i) and measured using the ImageJ

software. The experiments were performed in triplicates. The results were expressed as % of control.

2.8 Statistical analysis

All experiments were performed using independent biological triplicates and data were expressed as mean values $\pm$ standard deviation. For microbiological assays, statistical significance was analyzed using unpaired two-tailed Student's *t* tests (GraphPad Prism version 6.0). For toxicity analysis in *C. elegans* was used One-Way ANOVA, as also Tukey's multiple comparison test. A *p* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

2.9 Ethical aspects and funding source

The present study was approved by the research committee of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (COMPESQ/UFCSPA) under the number 028/2016 and was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPQ/Universal 14/2014) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (PRONEM FAPERGS/CNPq 11/2014).

3. Results

After extraction process yields obtained were 9.4 % for E1 and 8.5% for E2.

Antibiofilm and antimicrobial activities of E1 and E2 are showed in figures 1 and 2. Against *P. aeruginosa* strains both extracts did not show antibiofilm or

antimicrobial activities. Contrary, these extracts were able to stimulate biofilm formation and bacterial growth (figure 1). Concerning gram-positive strains, E1 and E2 showed significant biofilm inhibition without bacterial growth inhibition (figure 2). E1 was the most effective extract in inhibiting biofilm formation in *S. aureus* ATCC 6538 (65%) and E1 and E2 presented similar inhibition rates in *S. epidermidis* ATCC 35984 (75% and 78%, respectively). None of the extracts was able to eradicate preformed biofilm of the bacterial strains evaluated (data not shown).

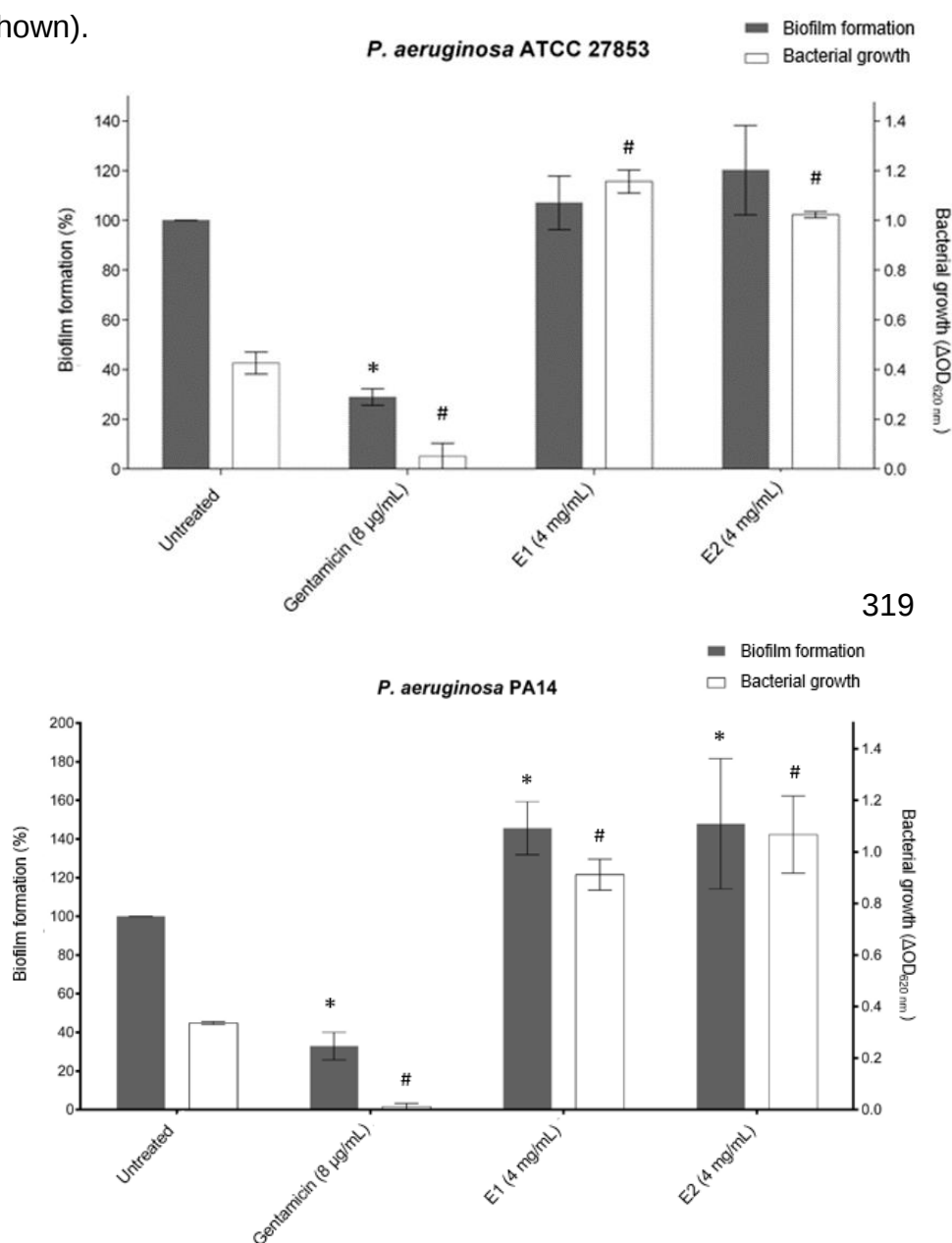


Figure 1. Biofilm formation and bacterial growth after *P. aeruginosa* strains exposure to E1 and E2. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation and # for bacterial growth in relation to the untreated control).

Since extracts did not present activities against *P. aeruginosa* strains and both extracts presented a major activity against *S. epidermidis* biofilm, we chosen this bacterium and E1 to conduct further assays. To corroborate the antimicrobial tests and confirm that E1 did not inhibit bacterial growth, CFU counting was performed in *S. epidermidis* showing that the antibiofilm effect is independent of bacterial cellular death (figure 2).

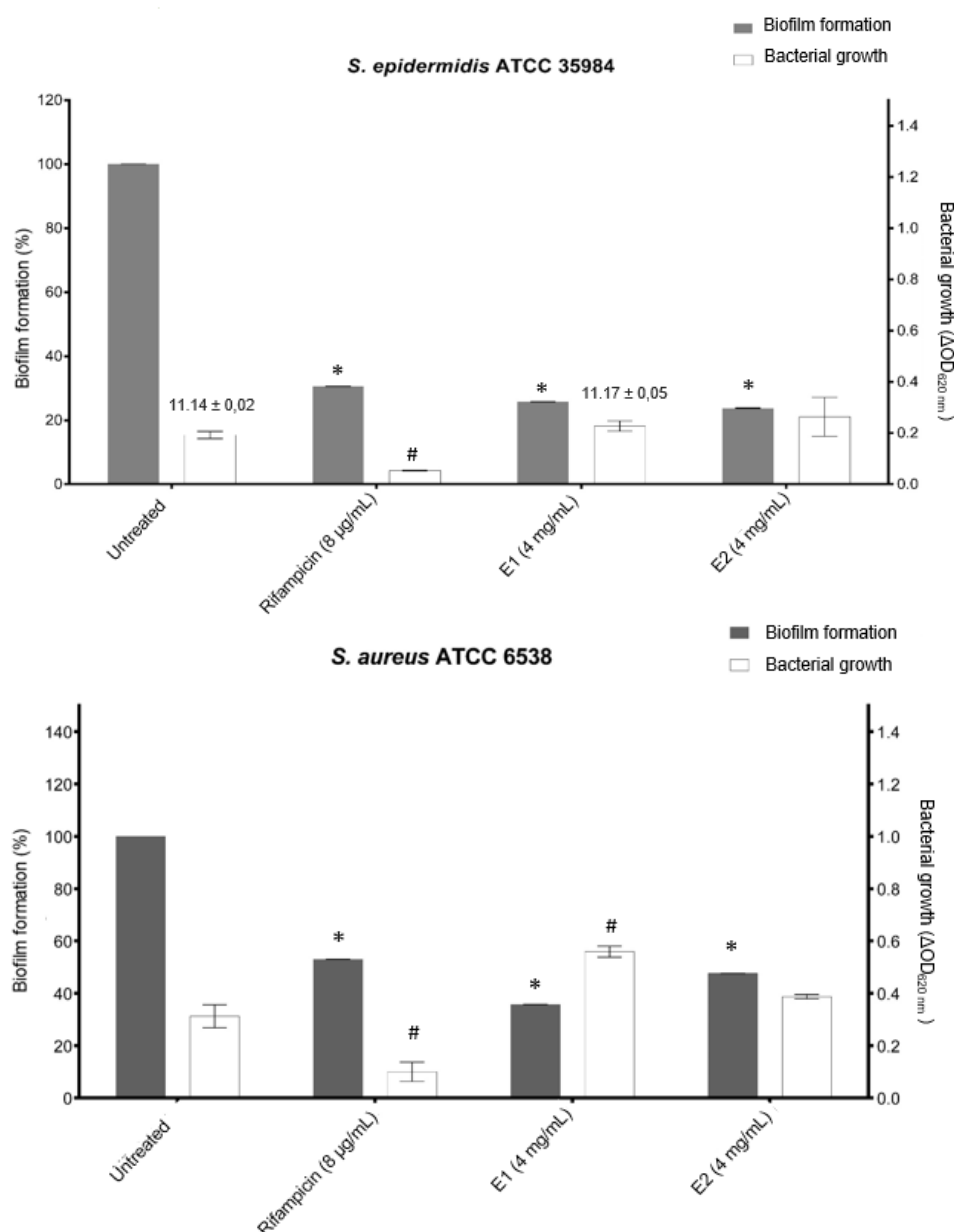


Figure 2. Biofilm formation and bacterial growth after *S. aureus* and *S. epidermidis* strains exposure to E1 and E2. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation and # for bacterial growth in relation to the untreated). Numbers above bars represent the CFU counting ($\log^{-1}$).

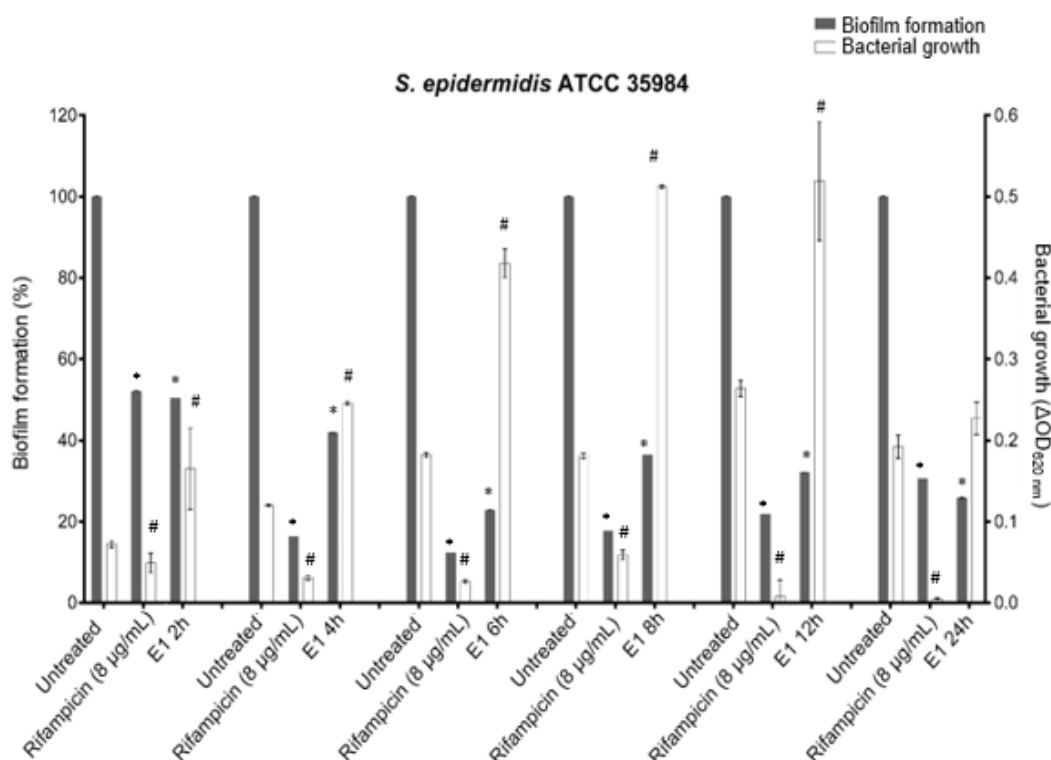


Figure 3. Biofilm formation and bacterial growth of *S. epidermidis* after different periods of treatment with E1. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation and # for bacterial growth in relation to the untreated control).

The variable exposure time assay demonstrated that at 6 h period of incubation an antibiofilm activity similar to the 24 h period was observed (figure 3). Based on this result all further microbiological assays were conducted with a 6 h period of incubation.

In order to evaluate the lower concentration of E1 that would show antibiofilm activity a dose-response curve was performed. At a concentration of 4 mg/mL E1 was able to inhibit in 75% *S. epidermidis* biofilm while half concentration (2 mg/mL) has shown a considerable but lower antibiofilm activity of about 48% of inhibition (figure 4). Lower concentrations have not shown antibiofilm activity.

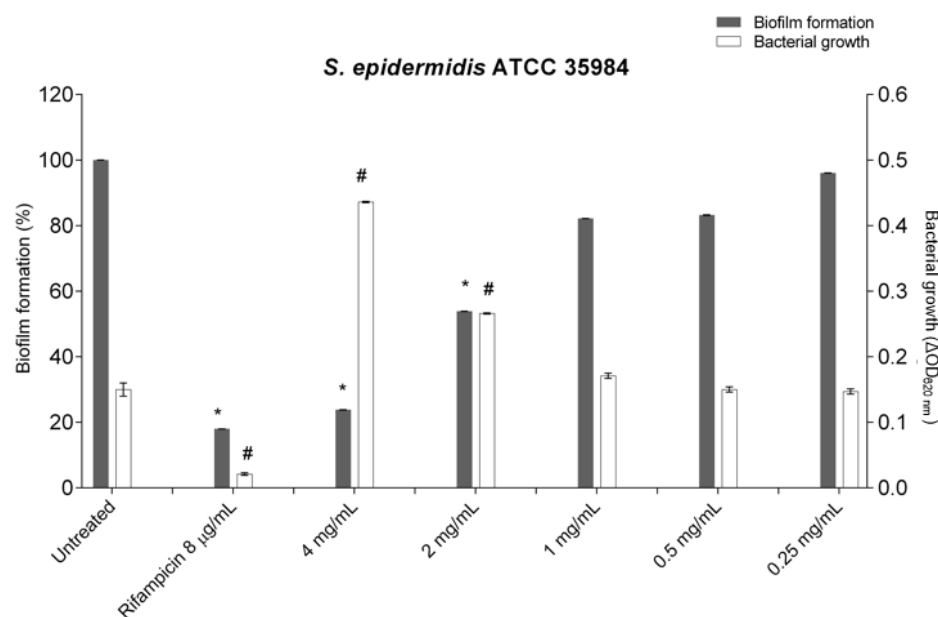


Figure 4. Dose-response curve of E1. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation and # for bacterial growth in relation to the untreated).

To determine if the extract had a reversible or irreversible effect in preventing bacterial adhesion an additional assay was performed. *S. epidermidis* was exposed to treatment with E1 during a 6 h period of incubation and then treatment was removed through washing cycles and a new biofilm was formed from free-treatment cells. In this assay it was observed that after a constant exposure to the treatment, *S. epidermidis* did not adhere to the surface (72% of biofilm inhibition) but once treatment is removed cells adhere again showing an equal biofilm formation as the untreated control (figure 5).

Concerning E1 chemical characterization, the TLC suggested the presence of amines/amino acids, steroids, saponins and terpenes. The content of total proteins, total flavonoids, total phenolic and tannins is presented in table 1.

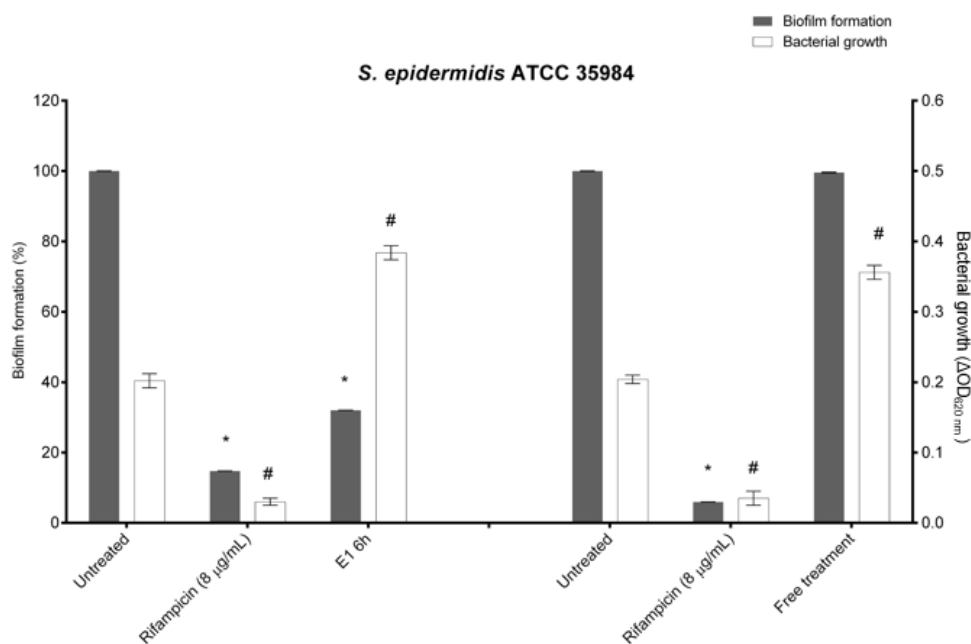


Figure 5. Determination of extract effect on biofilm (recovery assay). A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation and # for bacterial growth in relation to the untreated control).

Table 1. Chemical characterization of E1.

Class	Total content
Total proteins	3.34 mg/mL
Total flavonoids	71.1 $\mu\text{g/mL}$
Total phenolics	141.45 $\mu\text{g/mL}$
Condensed tannins	1.22 $\mu\text{g/mL}$
Hydrolysable tannins	Not detected

As soybeans are known for a high protein content (Chen et al., 2012) and chemical characterization has confirmed that its residues, like R1, also keep its high protein level (table 1) we hypothesized that active compounds in E1 may have a protein origin. To evaluate this possibility E1 was submitted to two types of pretreatments to verify the effects on the activity previously observed (figure 6). The results showed that when E1 is pretreated with a digestive enzyme (proteinase K), its antibiofilm activity decreases by about 30% and when it is submitted to a heat treatment it is inactivated. So, these results suggest that E1 antibiofilm active molecules are of protein origin.

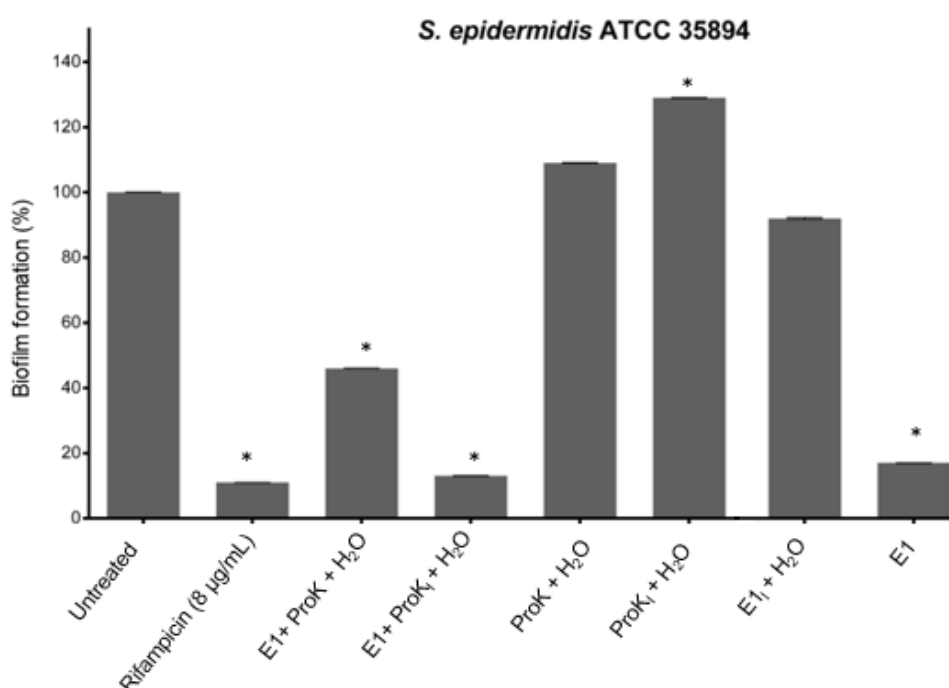


Figure 6. Antibiofilm assay using E1 heat and enzymatic pretreatments. E1 – extract 1; ProK – active proteinase K; ProK₁ – inactive proteinase K; H₂O – water; E₁ – boiled E1. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation in relation to the untreated control).

As suggested by the recovery assay, E1 can prevent *S. epidermidis* biofilm through a physical effect. A cell surface hydrophobicity assay was performed in order to evaluate if E1 could act in biofilm inhibition by modifying cells surface

hydrophobicity. Results showed that after being exposed to E1 treatment, *S. epidermidis* hydrophobicity has decreased in about 83% suggesting that E1 could alter cells surface increasing its hydrophilic properties (figure 7). Since we used a hydrophobic material (96 well polystyrene microtiter plates) as adhesion surface, the increasing in hydrophilicity could hinder the adhesion of *S. epidermidis*.

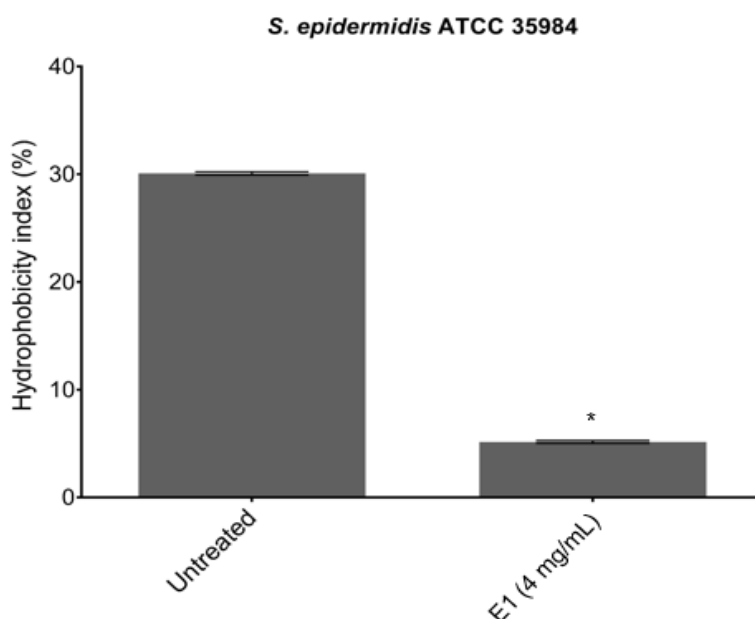
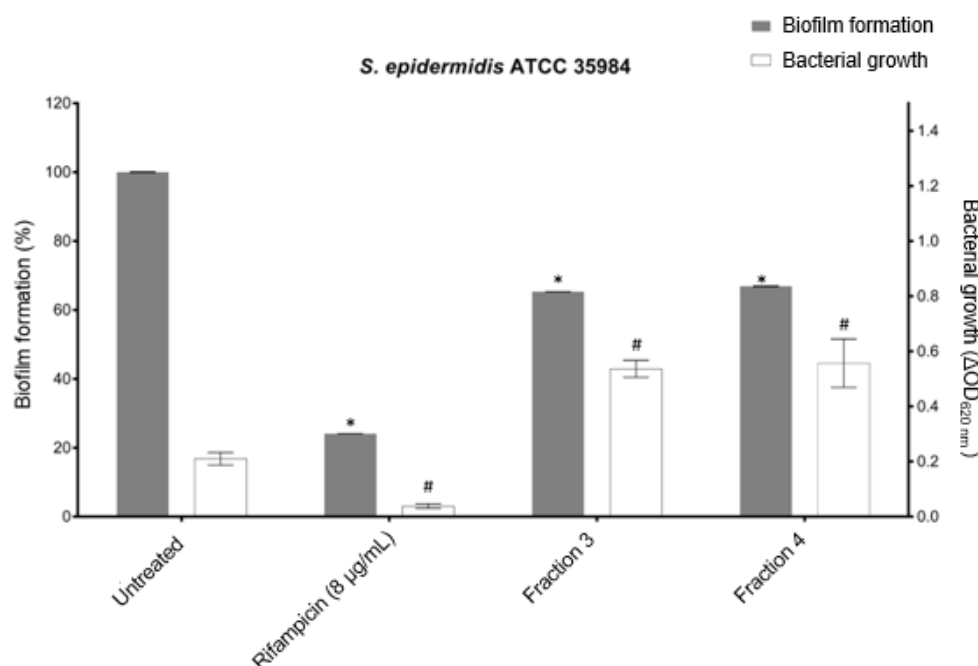


Figure 7. Effect of E1 on *S. epidermidis* cells surface hydrophobicity. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for hydrophobicity index in relation to the untreated control).

Only two from forty fractions obtained by fractionation with CC and denominated fractions 3 and 4 could have been used in microbiological assays, due to its quantities (10.2 mg and 12.1 mg, respectively). In this assay none of the fractions exhibit an antibiofilm activity similar to the extract (inhibition rates of 34.7% for fraction 3 and 32.9% for fraction 4) (figure 8).

530



531 **Figure 8.** Antibiofilm assay using two semi purified fractions of E1 tested at 4
 532 mg/mL concentration. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm
 533 formation and # for bacterial growth in relation to the untreated control).
 534

535 As both semi purified fractions collected after size exclusion CC showed a
 536 reduced antibiofilm activity, the extract was submitted to ultrafiltration process.
 537 By this approach, six fractions with protein content of different molecular weight
 538 ranges were obtained: < 10 kDa; > 10 kDa; < 30 kDa; > 30 kDa; < 50 kDa; and >
 539 50 kDa. These fractions were tested against *S. epidermidis* biofilm formation
 540 (figure 9) and it was observed that no fraction was able to inhibit the biofilm of
 541 this bacterium. However, when the fractions were combined, returning to their
 542 original composition (R10+F10, R30+F30 and R50+F50), the mixture recuperate
 543 the antibiofilm activity similar to the extract not submitted to separation (figure
 544 10).

545

546

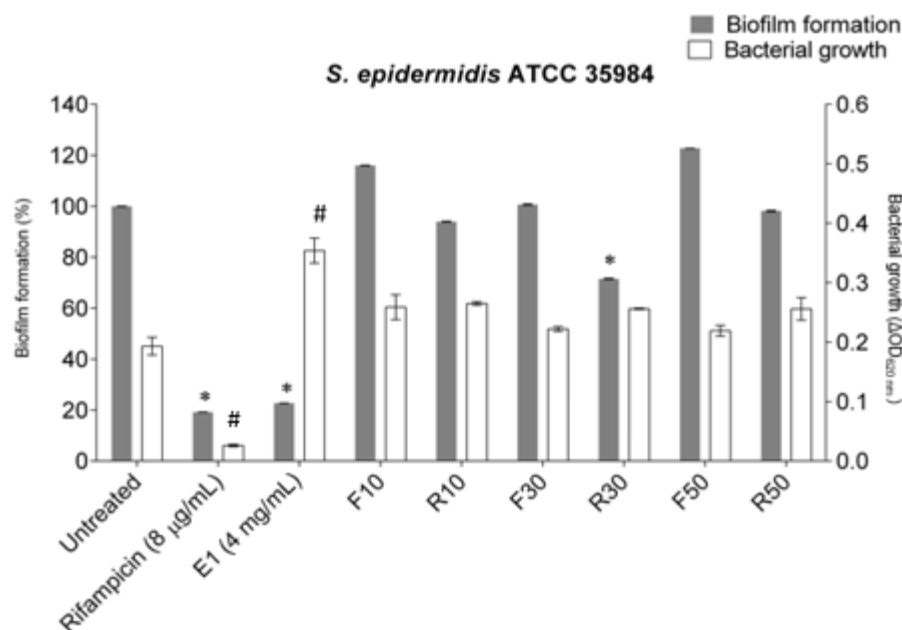


Figure 9. Antibiofilm assay using six semi purified fractions of E1 obtained through ultrafiltration. Filtrates are identified as F10, F30 and F50 and non-filtrates are identified as R10, R30 and R50. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation and # for bacterial growth in relation to the untreated control).

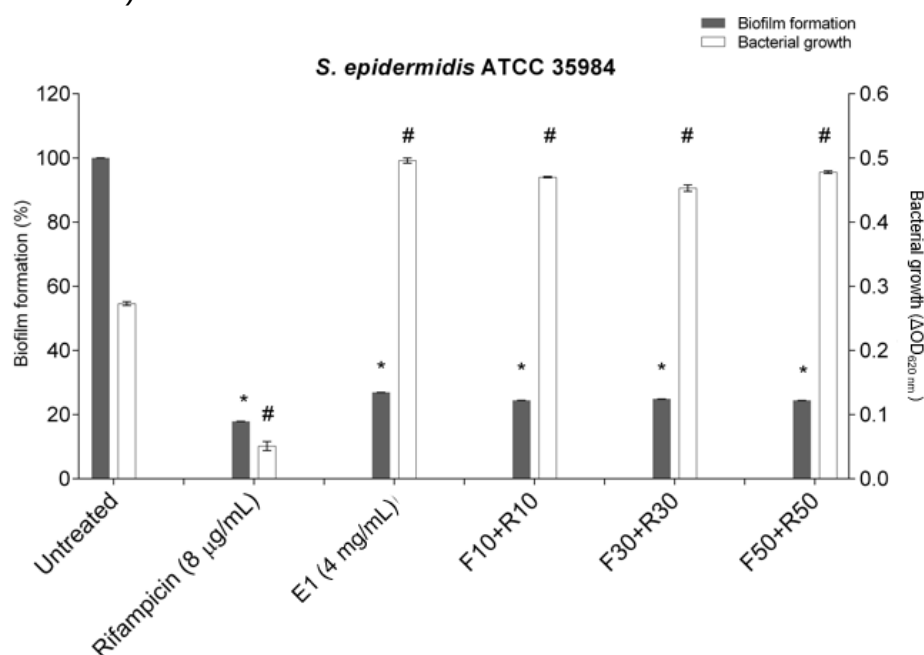


Figure 10. Antibiofilm assay using combined semi purified fractions of E1 obtained through ultrafiltration. Filtrates are identified as F10, F30 and F50 and non-filtrate are identified as R10, R30 and R50. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation and # for bacterial growth in relation to the untreated control).

Based on the previous results which suggested that E1 submitted to fractionation loses its antibiofilm activity, and also to evaluate the probable molecular weight of the active compound, the extract was submitted to an exhaustive ultrafiltration process. Briefly, the filtrates obtained were re-submitted to a lower molecular weight cut-off membrane, resulting in fractions F50, F30 and F10, respectively. The retained fractions were named R50, R30 and R10. All fractions isolated or combined were tested against *S. epidermidis* biofilm. As seen in results shown in figure 11, only the R50+F10 combination was able to inhibit strongly biofilm formation. This data suggests that antibiofilm activity is dependent of a synergism of different active compounds presenting molecular weights > 50 kDa and < 10 kDa.

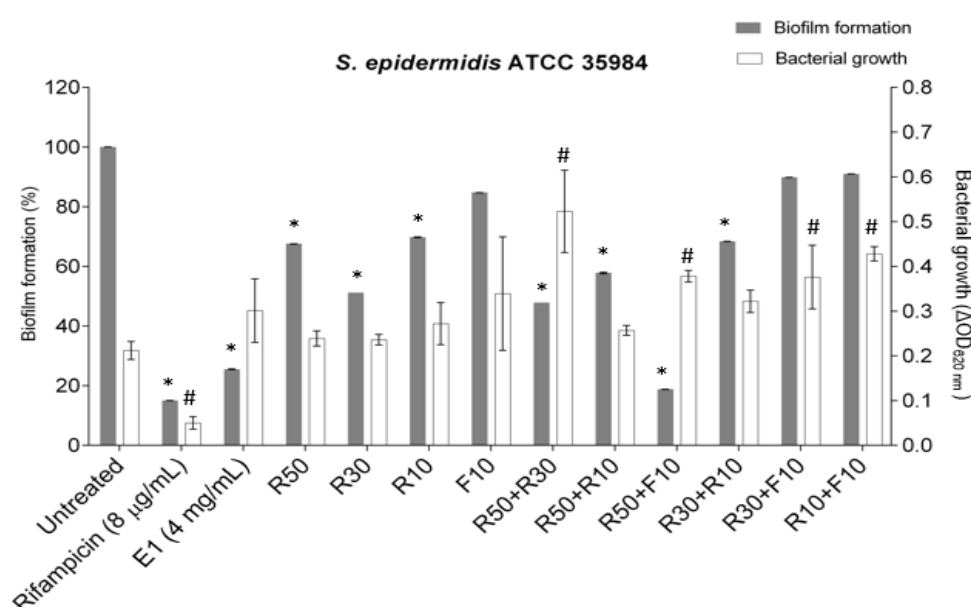


Figure 11. Antibiofilm assay using combined and separated partially purified fractions of E1 obtained through ultrafiltration. Filtrates are identified as F10, F30 and F50 and non-filtrate are identified as R10, R30 and R50. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* for biofilm formation and # for bacterial growth in relation to the untreated control).

In order to investigate the protein profile of E1 and active fraction

R50+F10, samples were submitted to a 15% SDS-PAGE. Analysis of E1 using

Coomassie Brilliant Blue revealed several protein bands, being the major bands located below 17 kDa and above 52 kDa (figura 12).

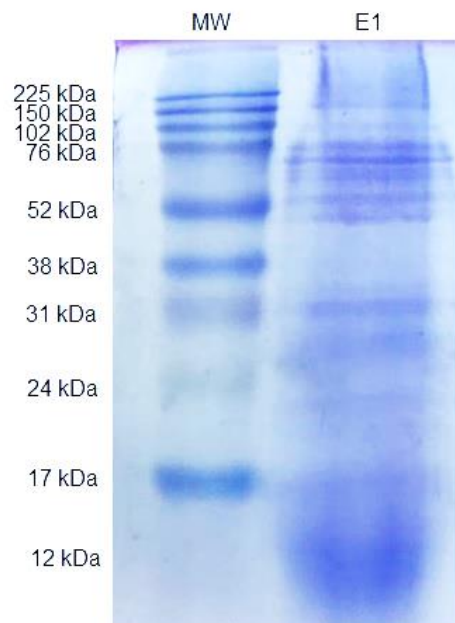


Figure 12. SDS-PAGE 15% stained with Coomassie Brilliant Blue showing proteins present in E1. MW – molecular weight marker.

Using a silver nitrate stain for E1 and R50+F10 samples it was possible to observe that major bands are located above 76 kDa for both samples, being the most evident band presented in R50+F10 fraction at this molecular weight (figure 13).

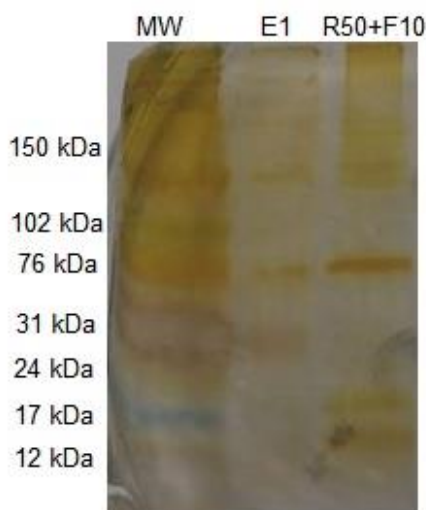


Figure 13. SDS-page gel stained with silver nitrate showing proteins present in E1 and R50+F10 fraction. MW – molecular weight marker.

We have also quantified total protein content of E1 and fraction R50+F10 (table 2). The results demonstrated that a protein content present in the fraction is 5 times lower when compared to the extract and was able to inhibit by about 79 % *S. epidermidis* biofilm.

Table 2. Total protein contents of E1 and R50+F10.

	Total protein content (mg/mL)	Biofilm inhibition (%)
Extract 1	3.34	75
R50+F10	0.67	79

For the purpose to verify the safety of E1, we have exposed the nematode *C. elegans* through two exposure protocols, acute and chronic. Our results demonstrate that the acute exposure does not alter the worms survival (Figure 14A); however, the chronic treatment (4 mg/mL) with E1 decreased the survival of the animals when compared to the control group (Figure 14B).

In relation to body length, the acute treatment did not alter the body length of the worms (figure 15A); interestingly, the chronic treatment with E1 at two concentrations evaluated, increased the body length of animals when compared to control group (figure 15B).

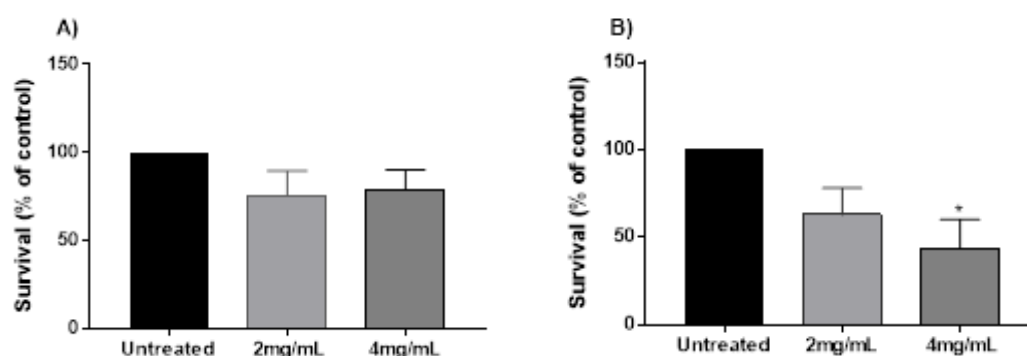


Figure 14. Survival assay. **A)** The acute exposure does not alter the survival of worms **B)** The chronic exposure at 4 mg/mL decreased the animals survival. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant (* in relation to the untreated control).

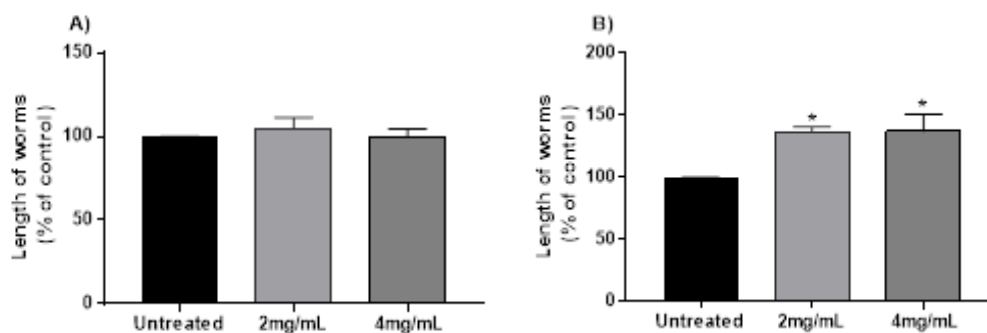


Figure 15. Body length. **A)** The acute exposure to extract E1 did not alter the survival of the worms. **B)** The chronic exposition to extract E1 (2 and 4 mg/mL) increased the body length of animals. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* in relation to the untreated control).

Our results also demonstrated that both treatments (acute and chronic) did not affect the reproductive profile of worms (figure 16A and B).

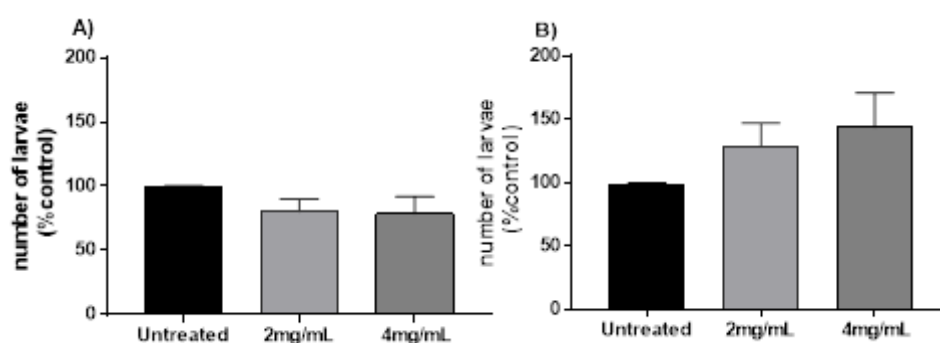


Figure 16. Brood size. **A)** Number of progeny after acute treatment with E1. **B)** Number of progeny after chronic exposition to E1.

GST expression is depicted in figure 17 and it was possible to observe an increase in the fluorescence of chronically exposed worms at two tested concentrations, thus indicating increase in GST-4 levels figure 17B). On the other hand, worms acutely exposed to 2 mg/ml depicted higher fluorescence.

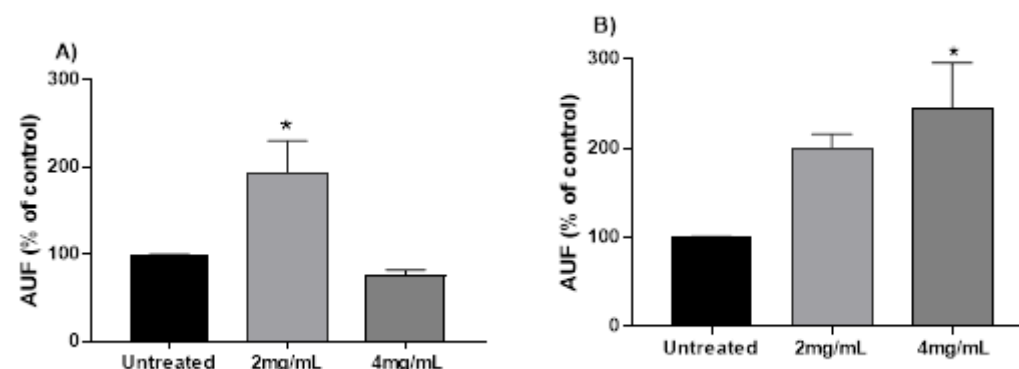


Figure 17. Intensity of fluorescence of glutathione S-transferase (gst-4:GFP) expression in strain CL2166. **A)** GST-4 gene expression was increased by E1 acute treatment at 2 mg/mL. **B)** The chronic exposition to worms at concentration of 4 mg/mL increase the intensity of GST fluorescence. A p value ≤ 0.05 was considered significant (* in relation to the untreated control).

4. Discussion and conclusion

Soybeans and its derivate products are highly consumed worldwide and their production chain is responsible for great part of agroindustrial waste generated (Chen et al., 2012; Li et al., 2013; Ho et al., 2014). Some previous studies have demonstrated that soybeans composition is rich in many bioactive compounds such as isoflavones and peptides and that its byproducts also can have similar compositions retaining most of the molecules of interest (Hong et al., 2006; Boia et al., 2013; Ghahari et al., 2017; Freitas et al., 2018).

In this study we demonstrated that an aqueous extract obtained from soybeans residue is effective in preventing *S. epidermidis* and *S. aureus* biofilm formation without bacterial growth inhibition but it is not effective against a gram-negative bacteria as *P. aeruginosa*. In relation to *S. epidermidis*, results based on different periods of bacterial cells exposed to treatment with E1 showed that the extract inhibits biofilm formation on its initial steps, therefore being not active when tested against a preformed biofilm. Concerning E1 chemical composition, proteins were the major components and the other three phytochemical classes were found in lower quantities, what is according to previous studies that analyzed soybeans residues (Tyug et al., 2010; Freitas et al., 2018).

The protein content of soybeans is about 35-40% of their dry weight, which is composed of storage proteins, such as α -, β - and γ conglycinins, glycine and other globulins, with different physico-chemical properties. Of these, β -

conglycinin (β CG, 7S-360 kDa) and glycinin (11S-150 kDa) are considered the main storage proteins, making up to 80 to 90% of the total protein content of soybeans and having all essential amino acids to human health (Zarkadas et al., 2007; Xiao, 2008). β CG is composed of three subunits (α' – 76 kDa, α – 72 kDa and β – 52 kDa) and glycinin has acid and basic subunits, and the variation of its subunit composition is related to differences in its functional properties (Wolf, 1970; Kilara & Harwalker, 1996, Sitohy et al., 2012). The bioactive properties of these proteins are mainly related to their peptides, inactive when part of the original molecule and active when submitted to fermentation, food processing and enzymatic processes (Singh et al., 2014). In a study by Sitohy et al. (2011), β CG, glycinin and one of its basic subunits (50 to 65 kDa) were isolated from soybeans and evaluated for their antimicrobial properties. The three fractions showed activity against pathogenic bacteria and food contaminants (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* and *Salmonella enteritidis*) in the following order: basic subunit > glycinin > β CG, indicating higher activity of the isolated subunit from the original molecule. These results could indicate that subunits with lower molecular weight may be responsible for the antimicrobial activity when compared to the whole protein molecule.

Since E1 demonstrated a high protein content and diverse studies mention soybeans as a natural source of active peptides with antimicrobial activities (Agyei, 2015; Liu et al., 2016; Xiang et al., 2017; Freitas et al, 2018) we submitted E1 to treatments that would degrade proteins and decrease or extinguish its antibiofilm activity. After the treatments, E1 showed lower antibiofilm activity suggesting that the active compound is sensible to high temperatures and partially affected by enzymatic digestion. When submitted to an ultrafiltration

process E1 was separated in portions containing molecules of different sizes that showed no antibiofilm activity when tested separately but only when combined, suggesting that E1 could have a synergistic mode of action. In order to determine the size of active compounds we separated and combined these different portions and results indicated that antibiofilm activity is restored when molecules > 50 kDa and <10 kDa are combined.

A previous study (Soares et al., 2013) that has evaluated the antimicrobial activity of a crude aqueous extract obtained from soymeal, demonstrated the presence of several molecules with low molecular weights (from 5 to 14 kDa) in the active fractions obtained after molecular weight-based fractioning. According to Farrokhi and colleagues (2008), most peptides presenting antimicrobial activities are sourced from major protein precursors that sometimes only become active after proteolysis processes. Most of known soybeans active molecules with antimicrobial activity are large proteins and have a bactericidal effect. Our SDS-PAGE results have confirmed the presence of molecules with molecular weights higher than 50 kDa, actually higher than 76 kDa, and lower than 17 kDa, indicating that the interaction between small and large molecules may be important for the biological activity since only the F10 junction with R50 was active against the *S. epidermidis* biofilm. The R50+F10 fraction has presented very similar major bands to E1, with some bands appearing more concentrated in the fraction when compared to the extract (76 kDa, 17 kDa and 12 kDa) indicating that these proteins may be involved with the bioactivity of the sample. Also, after ultracentrifugation processes, active molecules were concentrated and fraction R50+F10 with a lower quantity of proteins than E1 has shown a higher percentage of biofilm inhibition.

Most part of molecules related to proteins that have antimicrobial activity act by interacting with bacterial cell membranes and its components (Brogden, 2005). Our results show that E1 alters *S. epidermidis* cells hydrophobicity and they become more hydrophilic showing less adhering properties in early biofilm formation steps. The recovery assay results suggest that E1 has a reversible effect on *S. epidermidis* cells and only is effective when in continuous contact. This reversible effect may be due to a physical effect caused by bounds among cell wall and active compounds that form a protective layer on bacterial surface since it is known that protein molecules can be adsorbed in cells surfaces (Brogden, 2005). Further assays such as scanning electron microscopy will be realized in order to visualize bacterial cells when in contact with E1.

In a study conducted by Ponnusha and colleagues (2011), antioxidant and antimicrobial properties of soybeans were evaluated and regarding to their chemical composition and biological activities, isoflavones were the most active compounds responsible for their actions against gram-positive and gram-negative bacteria with high antioxidant activity. Wang et al. (2017) also evaluated antioxidant and antimicrobial activities of soybeans, and they found similar results to Ponnusha et al. (2011). In this context, besides molecules with protein origin other compounds presented in soybeans composition could contribute to the results found in this study since flavonoids content was also similar to found in these studies that analyzed whole soybeans.

The nematode *Caenorhabditis elegans* has been used as a valuable tool in toxicology due to the high level (60–80%) of genetic homology with humans (Kaletta and Hengartner, 2006). Beyond that, *C. elegans* is a highly attractive model for assessing toxicity, because this nematode offers a wide variety of

ecologically and toxicologically relevant endpoints, such as mortality, growth, and reproduction (Tejeda-Benitez and Olivero-Verbel, 2016). Indeed, *C. elegans* has been used to evaluate residual toxicity during conventional and advanced wastewater treatment (Abbas et al., 2018, Han et al., 2018, Tejeda-Benitez et al., 2018).

Our results demonstrated that the acute treatment with the E1 extract did not cause toxicological effects in *C. elegans*. However, in relation to chronic exposure, the treatment with the highest concentration (4 mg/mL) decreased the survival of the worms. This finding suggests that a longer time of exposure to the E1 extract may cause toxic effects when compared to shorter treatment exposure. Furthermore, the chronic treatment also increased the length of worms at concentrations tested, which may be suggesting that extract E1 stimulates the worm's development, without affecting the reproductive profile, despite the visible tendency.

A possible explanation for this increase is that chronic exposure to the extract stimulated the worm development, or perhaps even accelerating aging. Some studies show the relation between alterations in the energetic metabolism can be influenced by nutritional factors in which the activating pathways are associated with longevity and cellular metabolism, as TOR and insulin (MacNeil et al., 2013). In this context, it has been demonstrated that alterations in nutrition state could have some toxic effect in nematodes (MacNeil et al., 2013). For example, the supplementation of vitamin B12 can regulate gene expression, accelerate development, and affect worms fertility (Watson et al., 2014). Furthermore, accelerating *C. elegans* development could be a toxic response and may result in a reduction of their lifespan (Ludewig et al., 2017). In addition, this

accelerated development induced by extract E1 could be associated with the decreased of survival of worms, as a response to some toxic effect of this extract.

Overall, the worms from the chronic exposure were smaller than those from the acute treatment. That is caused by the longer maintenance in liquid media treatment (30 minutes vs 24h) that is known by delaying development (Szewczyk et al., 2006). Therefore, the chronic exposure to E1 extract which is rich mainly in proteins may have enriched the medium and accelerated worms development in relation to untreated worms.

In addition, our results also demonstrated an increase in the expression of GST-4, which indicates a major stress resistance in the worms treated with extract E1. One possible explanation to these results is the antioxidant property already attributed to soybean, which could be associate with the increase of antioxidants enzymes. In agreement with our results, it has been demonstrated in *C. elegans* that isolated peptides from soybean protected against the oxidative stress, trough extending worms life expectancy and reducing the reactive oxygen species (ROS) production (Ma et al., 2016). This may be caused because when the hydrolysis of proteins occur, molecules with bioactivity could be released, which are capable of increasing the activity of antioxidants enzymes, as the superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase (Lee, 2006).

Another possible explanation it that the extract has a hormetic effect in worms, promoting a holistic and integrated adaptive cellular response which protect cells against severe stress. This occurs because the consecutive deterioration of protein homeostasis and stress resistance accelerates the protein unfolding at subcellular level, which causes rapid aging progress (Gems and Partridge, 2008, Rattan, 2008). As consequence the activation of these genes

responsible for protein homeostasis and stress resistance through internal or external factors such as hormetic drugs have been evidenced (Gems and Partridge, 2008, Rattan, 2008). In agreement, several studies demonstrated the hormetic action of different compounds, extending the healthy lifespan of worms via Heat shock factor-1(HSF-1), DAF-16/FOXO3, SKN-1/Nrf2 signaling pathways and increased expression of antioxidants enzymes (Rainey et al., 2015, Zhang et al., 2017, Govindan et al., 2018).

The reuse of agroindustrial waste has become of great interest and due to the great amount of soybeans residues produced worldwide they can be considered a source for obtention of natural compounds of biotechnological interest (Vandamme, 2009; Mussato et al., 2012, Lemes et al., 2016). Also, new alternatives to reuse soybeans residues may be presented as an important factor that would decrease its potential harmful aspect. Microbial biofilms are a major challenge in many sectors mainly in clinical and industrial environments. New strategies to prevent and/or combat biofilms are needed and incorporation of molecules and compounds to surfaces materials has risen in interest as an alternative (Artini et al., 2017). The extract evaluated in this study has showed important antibiofilm activity against *S. epidermidis* and *S. aureus in vitro* and low toxicity *in vivo*, which can be managed by the concentration used. The compounds with biological activity appear to be of protein origin and act synergistically via physical effect. Further assays concerning its active compounds and path of action will be performed in order to suggest its possible applications.

5. References

- Abbas, A., Valek, L., Schneider, I., Bollmann, A., Knopp, G., Seitz, W., & Wagner, M. (2018). Ecotoxicological impacts of surface water and wastewater from conventional and advanced treatment technologies on brood size, larval length, and cytochrome P450 (35A3) expression in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 13868-13880.
- Agvei, D. (2015). Bioactive proteins and peptides from soybeans. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 7(2), 100-107.
- Artini, M.; Cicatiello, P.; Ricciardelli, A.; Papa, R.; Selan, L.; Dardano, P. & Parrilli, E. (2017). Hydrophobin coating prevents *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation on different surfaces. *Biofouling*, 33(7), 601-611.
- Boia, N.; Penteado, A. L.; Dias, G.; Porte, A.; Koblitz, M. G. B., (2013). Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de soja contra patógenos transmitidos por alimentos. EMBRAPA Publicações.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature reviews microbiology*, 3(3), 238.
- Chang C. C, Yang M. H, Wen H. M; Chern J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10: 178-182
- Chen, K. I.; Erh, M. H.; Su, N. W.; Liu, W. H.; Chou, C. C.; Cheng, K. C., (2012). Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 1, 9-22.
- Da Silva Trentin, D.; Giordani, R. B.; Zimmer, K. R.; Da Silva, A. G.; Da Silva, M. V.; dos Santos Correia, M. T.; & Macedo, A. J. (2011). Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 327-335.
- Depuydt G.; Xie, F.; Petyuk, V.A, Smolders, A; Brewer, HM; Camp, DG, 2nd, Smith RD, Braeckman BP (2014). LC-MS proteomics analysis of the insulin/IGF-1-deficient *Caenorhabditis elegans* daf-2(e1370) mutant reveals extensive restructuring of intermediary metabolism. *Journal of proteome research* 13:1938-1956.
- Farrokhi, N., Whitelegge, J. P., & Brusslan, J. A. (2008). Plant peptides and peptidomics. *Plant biotechnology journal*, 6(2), 105-134.
- Flemming, H.C.; Wingender, J., (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623–633.

Freitas, C., Alves da Silva, G., Perrone, D., A Vericimo, M., dos S Baião, D., R Pereira, P., & M Del Aguila, E. (2019). Recovery of Antimicrobials and Bioaccessible Isoflavones and Phenolics from Soybean (*Glycine max*) Meal by Aqueous Extraction. *Molecules*, 24(1), 74.

Gems D, Partridge L (2008) Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell metabolism* 7:200-203.

Ghahari, S.; Alinezhad, H.; Nematzadeh, G. A.; Tajbakhsh, M. & Baharfar, R. (2017). Chemical composition, antioxidant and biological activities of the essential oil and extract of the seeds of *Glycine max* (Soybean) from North Iran. *Current microbiology*, 74(4), 522-531.

Govindan, S; Amirthalingam, M; Duraisamy, K; Govindhan, T; Sundararaj, N; Palanisamy, S(2018) Phytochemicals-induced hormesis protects *Caenorhabditis elegans* against alpha-synuclein protein aggregation and stress through modulating HSF-1 and SKN-1/Nrf2 signaling pathways. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 102:812-822.

Guang, C.; Chen, J.; Sang, S.; Cheng, S., (2014). Biological functionality of soyasaponins and soyasapogenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 33, 8247-8255.

Guo Y; Yang Y; Wang D.(2009) Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages. *Reproductive toxicology* 28:90-95.

Hall KD et al. (2015) Calorie for Calorie, Dietary Fat Restriction Results in More Body Fat Loss than Carbohydrate Restriction in People with Obesity. *Cell metabolism* 22:427-436.

Ho, D. P.; Ngo, H. H.; Guo, W., (2014) A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource technology*, 169, 742-749.

Hong, H., Landauer, M. R., Foriska, M. A., & Ledney, G. D. (2006). Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein. *Journal of basic microbiology*, 46(4), 329-335.

Hsieh, C.; Yang, F-C., (2004). Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, 91, 1, 105-109.

Kaletta T; Hengartner MO (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature reviews Drug discovery* 5:387-398.

Kilara, A., and V. R. Harwalkar. 1996. Denaturation. Pages 71– 165 in *Food Proteins: Properties and Characterization*. S. Nakai and H. W. Modler, ed. VCH Publishers, New York.

Lee JS (2006) Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life sciences* 79:1578-1584.

Lemes, A. C.; Álvares, G. T.; Egea, M. B.; Brandelli, A.; Kalil, S. J., (2016). Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agroindustrial by-products. *Bioresource technology*, 222, 210-216.

Lewis, K., (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45, 4, 999-1007.

Li, S.; Zhu, D.; Li, K.; Yang, Y.; Lei, Z.; Zhang, Z., (2013). Soybean curd residue: composition, utilization, and related limiting factors. *ISRN Industrial Engineering*.

Limsuwan, S., & Voravuthikunchai, S. P. (2008). *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Eleutherine americana* Merr. and *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as antibiofilm producing and antiquorum sensing in *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53(3), 429-436.

Liu, M.; Wang, Y.; Liu, Y. & Ruan, R., (2016). Bioactive peptides derived from traditional Chinese medicine and traditional Chinese food: A review. *Food Research International*, 89, 63-73.

Locke AE, et al (2015) Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 518:197-206.

Ludewig AH, Gimond C, Judkins JC, Thornton S, Pulido DC, Micikas RJ, Doring F, Antebi A, Braendle C, Schroeder FC (2017) Larval crowding accelerates *C. elegans* development and reduces lifespan. *PLoS genetics* 13:e1006717.

Ma H, Liu R, Zhao Z, Zhang Z, Cao Y, Ma Y, Guo Y, Xu L (2016) A Novel Peptide from Soybean Protein Isolate Significantly Enhances Resistance of the Organism under Oxidative Stress. *PloS one* 11:e0159938.

MacNeil LT, Watson E, Arda HE, Zhu LJ, Walhout AJ (2013) Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*. *Cell* 153:240-252.

Makris, D. P.; Boskou, G; Andrikopoulos, N. K., (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 2,125-132.

Melo, P. S.; Bergamaschi, K. B.; Tiveron, A. P.; Massariolli, A. P.; Oldoni, T. L. C.; Zanús, M. C.; Pereira, G. E.; Alencar, S. M., (2011). Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural*,41, 6, 1088-1093.

Mussatto, S.; Ballesteros, L. F.; Martins, S.; Teixeira, J. A., (2012). Use of agroindustrial wastes in solid-state fermentation processes. In: YEOW, S.K.; XINXIN, G. *Industrial Waste, InTech*.

Oniszcuk, A., Podgórski, R., Oniszcuk, T., Żukiewicz-Sobczak, W., Nowak, R., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2014). Extraction methods for the determination of

phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb. Industrial Crops and Products, 61, 377-381.

Ponnusha, B. S., Subramaniam, S., & Pasupathi, P. (2011). Antioxidant and Antimicrobial properties of *Glycine Max*-A review. Int J Cur Bio Med Sci., 1(2), 49-62.

Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26(5), 1214-1218.

Rainey N, Motte L, Aggarwal BB, Petit PX (2015) *Curcumin* hormesis mediates a cross-talk between autophagy and cell death. Cell death & disease 6:e2003.

Rattan SI (2008) Hormesis in aging. Ageing research reviews 7:63-78.

Rochelle, S. L.; Sardi, J. D. C. O.; Freires, I. A.; De Carvalho Galvão, L. C.; Lazarini, J. G.; De Alencar, S. M.; Rosalen, P. L., (2016). The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens. Industrial Crops and Products, 87, 150-160.

Rosa, M. F.; Souza Filho, M. S. M.; Figueiredo, M. C. B.; Morais, J. P. S.; Santaella, S. T.; Leitão, R. C., (2011). Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais–II SIGERA, v. 15.

Sitohy, Mahmoud Z.; Mahgoub, Samir A.; Osman, Ali O, (2012). *In vitro* and *in situ* antimicrobial action and mechanism of glycinin and its basic subunit. International journal of food microbiology, 154, 1-2, 19-29.

Srey, S; Jahid, I. K.; Ha, S-D., (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food Control, 31, 2, 572-585.

Szewczyk N.J, Udranszky I.A, Kozak E, Sunga J, Kim S.K, Jacobson L.A, Conley CA (2006) Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in *C. elegans* under dietary restriction. The Journal of experimental biology 209:4129-4139.

Tejeda-Benitez L, Olivero-Verbel J (2016) *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. Reviews of environmental contamination and toxicology 237:1-35.

Tejeda-Benitez L, Noguera-Oviedo K, Aga DS, Olivero-Verbel J (2018) Toxicity profile of organic extracts from *Magdalena River* sediments. Environmental science and pollution research international 25:1519-1532.

Tyug, T. S.; Prasad, K. N.; Ismail, A.; (2010). Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. Food Chemistry, 123, 583-589.

Vandamme, E. J., (2009). Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products. In: NIGAM, P. S.N; PANDEY, A. Biotechnology for AgroIndustrial Residues Utilisation. Springer.

Von Borowski, R. G.; Zimmer, K. R.; Leonardi, B. F.; Trentin, D. s.; Silva, R. C.; De Barros, M. P.; Macedo, A. J.; Gnoatto, S. C. B.; Gosmann, G.; Zimmer, A. R., (2019). Red pepper *Capsicum baccatum*: source of antiadhesive and antibiofilm compounds against nosocomial bacteria. Industrial Crops and Products, 127, 148-157.

Watson E, MacNeil LT, Ritter AD, Yilmaz LS, Rosebrock AP, Caudy AA, Walhout AJ (2014) Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits. Cell 156:759-770.

Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of apicultural research, 37(2), 99-105.

Xiang, N., Lyu, Y., Zhu, X., Bhunia, A. K., & Narsimhan, G. (2017). Effect of physicochemical properties of peptides from soy protein on their antimicrobial activity. Peptides, 94, 10-18.

Xiao, Chao Wu. Health effects of soy protein and isoflavones in humans, (2008). The Journal of nutrition, 138, 6, 1244S-1249S.

Zarkadas, C.G.; Gagnon, C.; Gleddie, S.; Khanizadeh, S.; Cober, E.R.; Guillemette, R.J.D. (2007). Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis. Food Research International, 40, 129-146.

Zhang C, Li C, Chen S, Li Z, Ma L, Jia X, Wang K, Bao J, Liang Y, Chen M, Li P, Su H, Lee SM, Liu K, Wan JB, He C (2017) Hormetic effect of panaxatriol saponins confers neuroprotection in PC12 cells and zebrafish through PI3K/AKT/mTOR and AMPK/SIRT1/FOXO3 pathways. Scientific reports 7:41082.

Zimmer, A. R.; Leonardi, B.; Zimmer, E. R.; Kalinine, E.; de Souza, D. O.; Portela, L. V.; Gosmann, G. (2012). Long-term oral administration of *Capsicum baccatum* extracts does not alter behavioral, hematological, and metabolic parameters in CF1 mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Zimmer, K. R.; Macedo, A. J.; Giordani, R. B.; Conceição, J. M.; Nicastro, G. G.; Boechat, A. L.; Termignoni, C., (2013). A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus)* microplus inhibits bacterial biofilms. Environmental microbiology, 15(7), 2008-2018.

4. DISCUSSÃO

A soja e seus derivados são altamente consumidos no mundo e sua cadeia produtiva é responsável por grande parte dos resíduos agroindustriais gerados (Chen et al., 2012; Li et al., 2013; Ho et al., 2014). Alguns estudos anteriores demonstraram que a soja é rica em muitos compostos bioativos, como isoflavonas e peptídeos, e que seus subprodutos também podem ter composições similares, mantendo a maioria das moléculas de interesse (HONG et al., 2006; BOIA et al., 2013; GHAHARI et al., 2017; FREITAS et al., 2018).

Neste estudo demonstramos que um extrato aquoso obtido a partir do resíduo de soja é eficaz na prevenção da formação de biofilme de *S. epidermidis* e *S. aureus* sem inibição do crescimento bacteriano, mas não é efetivo contra bactérias gram-negativas como *P. aeruginosa*. Bactérias gram-negativas de forma geral são mais resistentes a antimicrobianos devido à sua estrutura celular, a qual conta com a presença de membrana externa, ausente nas bactérias gram-positivas. Em relação a moléculas obtidas a partir de um resíduo de soja, a torta de soja, Villalobos et al. (2016) demonstraram que bactérias gram-positivas são mais sensíveis a ação antimicrobiana destes compostos do que bactérias gram-negativas, reforçando que a ação destes compostos pode ser relacionada às diferenças entre os tipos celulares. Assim, um ponto importante a ser observado é que E1 apresenta atividade antibiofilme sem apresentar atividade antimicrobiana, agindo portanto, diretamente em um dos principais fatores de virulência de duas espécies estafilocócicas responsáveis por infecções crônicas, principalmente relacionadas a formação de biofilme.

Em relação a *S. epidermidis*, resultados baseados em diferentes períodos de exposição das células bacterianas ao tratamento com E1, mostraram que o extrato inibe a formação de biofilme nas suas etapas iniciais, não sendo, portanto, ativo quando testado contra um biofilme pré-formado. A erradicação de um biofilme apresenta-se como um desafio, visto que devido a sua estruturação e presença de matriz exopolimérica, compostos não conseguem acessar as camadas mais profundas da estrutura, não havendo portanto, eliminação

completa das células viáveis (FLEMMING *et al.*, 2016). Neste caso, a combinação de métodos físicos e químicos de controle microbiano pode se apresentar como uma alternativa.

Quanto à composição química de E1, as proteínas foram os componentes majoritários e as outras três classes fitoquímicas avaliadas foram encontradas em menor quantidade, o que está de acordo com estudos anteriores que analisaram resíduos de soja através de extração aquosa (TYUG *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2018).

O teor de proteínas na soja é de cerca de 35-40% do seu peso seco, composto por proteínas armazenadoras, tais como conglícininas α , β e γ , glicina e outras globulinas, com diferentes propriedades físico-químicas. Destes, β -conglícinina (β CG, 7S-360 kDa) e glicinina (11S-150 kDa) são consideradas as principais proteínas de armazenamento, perfazendo até 80 a 90% do teor total de proteína da soja e tendo todos os aminoácidos essenciais para saúde humana (ZARKADAS *et al.*, 2007; XIAO, 2008). β CG é composta de três subunidades (α , α' , α e β) e a glicinina possui subunidades ácidas e básicas, e a variação de sua composição subunitária está relacionada a diferenças em suas propriedades funcionais (WOLF, 1970; KILARA & HARWALKER, 1996, SITOHY *et al.*, 2012). As propriedades bioativas dessas proteínas estão relacionadas principalmente a seus peptídeos, inativos quando parte da molécula original, e ativos quando submetidos à fermentação, processamento de alimentos e processos enzimáticos (SINGH *et al.*, 2014). Em um estudo de Sitohy *et al.* (2011), β CG, glicinina e uma de suas subunidades básicas foram isoladas da soja e avaliadas quanto às suas propriedades antimicrobianas. As três frações apresentaram atividade contra bactérias patogênicas e contaminantes alimentares (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella enteritidis*) na seguinte ordem: subunidade básica > glicinina > β CG, indicando maior atividade da subunidade isolada da molécula original. Esses resultados podem indicar que subunidades de menor massa molecular podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana quando comparadas à molécula de proteína total.

Devido ao fato de que E1 demonstrou alto teor proteico e diversos estudos mencionam a soja como fonte natural de peptídeos ativos com atividades antimicrobianas (AGYEI, 2015; LIU *et al.*, 2016; XIANG *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2018) submetemos E1 a tratamentos que degradariam proteínas e

diminuiriam ou extinguiriam sua atividade antibiofilme se esta fosse de origem proteica. Após os tratamentos, E1 mostrou menor atividade antibiofilme sugerindo que o composto ativo é sensível a altas temperaturas e parcialmente afetado pela digestão enzimática. Quando submetido a um processo de ultrafiltração E1 foi separado em frações contendo moléculas de tamanhos diferentes que não mostraram atividade antibiofilme quando testadas separadamente, mas apenas quando combinadas, sugerindo que E1 poderia ter um modo de ação sinérgico, como já sugerido por Freitas *et al.* (2018) para moléculas antimicrobianas isoladas de soja. A fim de determinar a massa molecular dos compostos ativos, separamos e combinamos essas diferentes frações e os resultados indicaram que a atividade antibiofilme é restaurada quando moléculas >50 kDa e < 10 kDa são combinadas.

Um estudo anterior (SOARES *et al.*, 2013) que avaliou a atividade antimicrobiana de um extrato aquoso bruto obtido da torta de soja, demonstrou a presença de várias moléculas com baixa massa molecular (de 5 a 14 kDa) nas frações ativas obtidas após ensaios de fracionamento. De acordo com Farrokhi e colaboradores (2008), a maioria dos peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana é proveniente de precursores proteicos maiores que às vezes só se tornam ativos após processos de proteólise. A maioria das moléculas ativas de soja com conhecidas atividades antimicrobianas são proteínas grandes e têm um efeito bactericida, visto que a maior parte das moléculas de origem proteica exerce este efeito através da formação de poros nas membranas celulares (BROGDEN, 2005). Nossos resultados de SDS-PAGE confirmaram a presença de moléculas com massas moleculares superiores a 50 kDa e inferiores a 17 kDa, sugerindo que a interação entre moléculas de diferentes tamanhos pode ser importante para a atividade antibiofilme sem levar à morte celular. A formação de complexos entre proteínas de diferentes tamanhos ou até mesmo ligações em sítios tamanho-específicos podem ser alternativas para explicar este efeito.

Grande parte das moléculas relacionadas às proteínas que possuem atividade antimicrobiana agem interagindo com as membranas celulares bacterianas e seus componentes (BROGDEN, 2005; PASUPULETI *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que E1 altera a hidrofobicidade das células de *S. epidermidis* tornando-as mais hidrofílicas, apresentando propriedades menos

aderentes nas etapas iniciais de formação de biofilme na superfície abiótica avaliada. Geralmente, peptídeos com atividade antimicrobiana possuem alta carga positiva e sendo as células bacterianas negativamente carregadas, ocorrem interações eletroestáticas que favorecem a ligação peptídeo-membrana (XIANG *et al.*, 2017). Os resultados do ensaio de recuperação sugerem que E1 tem um efeito reversível nas células de *S. epidermidis* e só é eficaz quando em contato contínuo com as mesmas. Este efeito reversível e físico pode ser devido a ligações entre a parede celular e compostos ativos que formam uma camada protetora na superfície bacteriana, uma vez que é sabido que moléculas proteicas podem ser adsorvidas na superfície das células (BROGDEN, 2005). Tais resultados sugerem que E1 é efetivo em prevenir a formação de um biofilme ao ser adsorvido na superfície celular, porém perde sua ação em um biofilme pré-formado possivelmente pela falta de acesso aos possíveis sítios de ligação. Outros ensaios, como microscopia eletrônica de varredura, serão realizados para visualizar células bacterianas quando em contato com E1.

Em um estudo realizado por Ponnusha e colaboradores (2011), as propriedades antioxidantes e antimicrobianas da soja foram avaliadas. Quanto à sua composição química e atividades biológicas, as isoflavonas foram os compostos mais ativos responsáveis por suas ações contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e importante atividade antioxidante. Wang *et al.* (2017) também avaliaram atividades antioxidantes e antimicrobianas da soja, e encontraram resultados semelhantes aos de Ponnusha *et al.* (2011). Nesse contexto, além de moléculas com origem proteica, outros compostos presentes na composição da soja poderiam contribuir para os resultados encontrados neste estudo, uma vez que o teor de flavonoides também foi semelhante ao encontrado em estudos prévios que analisaram grãos de soja propriamente ditos.

Os estudos avaliando atividade antibiofilme e resíduos agroindustriais são ainda escassos. Recentemente, Rochelle *et al.* (2016) avaliaram o potencial antibiofilme de 14 extratos de resíduos da agroindústria incluindo *Theobroma cacao* (cacau), *Coffea arabica* (café), *Psidium guajava* (goiaba), *Citrus sinensis* (laranja), *Malus domestica* (maçã), geoprópolis, *Punica granatum* (romã) e *Solanum lycopersicum* (tomate). Os autores encontraram promissora atividade antibiofilme de extratos obtidos dos resíduos de geoprópolis e romã. Diferente

dos achados do nosso estudo, a atividade de inibição dos biofilmes foi decorrente da inibição do crescimento microbiano (ROCHELLE *et al.*, 2016).

O nematoide *Caenorhabditis elegans* tem sido usado como uma ferramenta valiosa em toxicologia devido ao alto nível (60-80%) de homologia genética com humanos (KALETTA & HENGARTNER, 2006). Além disso, *C. elegans* é um modelo altamente atrativo para avaliar a toxicidade, porque esse nematoide oferece uma ampla variedade de parâmetros ecológicos e toxicologicamente relevantes, como mortalidade, crescimento e reprodução (Tejeda-Benitez e Olivero-Verbel, 2016). *C. elegans* tem sido usado para avaliar a toxicidade residual durante o tratamento convencional e avançado de águas residuárias (ABBAS *et al.*, 2018, HAN *et al.*, 2018, TEJEDA-BENITEZ *et al.*, 2018).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento agudo com E1 não causou efeitos toxicológicos em *C. elegans*. Porém, em relação à exposição crônica, o tratamento com maior concentração (4 mg/mL) diminuiu a sobrevivência dos vermes. Esse achado sugere que um tempo maior de exposição a E1 pode causar efeitos tóxicos quando comparado a uma menor exposição ao tratamento. Além disso, o tratamento crônico também aumentou o tamanho corporal dos vermes nas concentrações testadas, o que pode estar sugerindo que E1 estimula o desenvolvimento do verme, sem afetar o perfil reprodutivo, apesar da tendência visível.

Uma possível explicação para esse aumento é que a exposição crônica ao extrato estimulou o desenvolvimento dos vermes, ou talvez esteja até acelerando o envelhecimento. Alguns estudos mostram que a relação entre alterações no metabolismo energético pode ser influenciada por fatores nutricionais nos quais as vias ativadoras estão associadas à longevidade e metabolismo celular, como TOR e insulina (MACNEIL *et al.*, 2013). Neste contexto, foi demonstrado que alterações no estado nutricional podem ter algum efeito tóxico em nematoides (MACNEIL *et al.*, 2013). Por exemplo, a suplementação de vitamina B12 pode regular a expressão gênica, acelerar o desenvolvimento e afetar a fertilidade dos vermes (WATSON *et al.*, 2014). Além disso, acelerar o desenvolvimento de *C. elegans* pode ser uma resposta tóxica e pode resultar em uma redução de sua vida útil (LUDEWIG *et al.*, 2017). Além disso, esse desenvolvimento acelerado induzido pelo extrato E1 poderia estar

associado à diminuição da sobrevivência de vermes, como resposta a algum efeito tóxico desse extrato.

No geral, os vermes da exposição crônica foram menores que os do tratamento agudo. Isso é causado pela manutenção mais longa no tratamento com meio líquido (30 minutos *versus* 24 horas) que é conhecido por retardar o desenvolvimento (SZEWCZYK *et al.*, 2006). Portanto, a exposição crônica a E1, que é rico principalmente em proteínas, pode ter enriquecido o meio e acelerado o desenvolvimento dos vermes em relação aos não tratados.

Além disso, nossos resultados também demonstraram um aumento na expressão de GST-4, que indica uma grande resistência ao estresse nos vermes tratados com E1. Uma possível explicação para esses resultados é a propriedade antioxidante já atribuída à soja, que poderia estar associada ao aumento de enzimas antioxidantes. De acordo com nossos resultados, já foi demonstrado em *C. elegans* que peptídeos isolados de soja protegem contra o estresse oxidativo, através da extensão da expectativa de vida dos vermes e reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MA *et al.*, 2016). Isso pode ser causado porque, quando ocorre a hidrólise de proteínas, moléculas com bioatividade podem ser liberadas, capazes de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase (LEE, 2006).

Outra possível explicação é que o extrato tem um efeito hormético em vermes, promovendo uma resposta celular adaptativa, holística e integrada, que protege as células contra o estresse severo. Isso ocorre porque a deterioração consecutiva da homeostase protéica e resistência ao estresse acelera a proteína se desdobrando no nível subcelular, o que causa um rápido progresso do envelhecimento (GEMS & PARTRIDGE, 2008; RATTAN, 2008). Como consequência, a ativação desses genes responsáveis pela homeostase proteica e resistência ao estresse por meio de fatores internos ou externos, como drogas hormonais, tem sido evidenciada (GEMS & PARTRIDGE, 2008; RATTAN, 2008). De acordo, vários estudos demonstraram a ação hormética de diferentes compostos, estendendo o tempo de vida saudável de vermes via vias de sinalização de choque térmico fator 1 (HSF-1), DAF-16 / FOXO3, SKN-1 / Nrf2 e aumento da expressão de enzimas antioxidantes (RAINEY *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017; GOVINDAN *et al.*, 2018).

A reutilização de resíduos agroindustriais tem se tornado de grande interesse e devido à grande quantidade de resíduos de soja produzidos mundialmente, pode ser considerada uma fonte de obtenção de compostos naturais de interesse biotecnológico (VANDAMME, 2009; MUSSATO *et al.*, 2012, LEMES *et al.*, 2016). Além disso, novas alternativas de reutilização de resíduos de soja podem ser apresentadas como um fator importante que diminuiria seu potencial aspecto prejudicial. Os biofilmes microbianos são um grande desafio em muitos setores, principalmente em ambientes clínicos e industriais. Novas estratégias para prevenir e/ou combater biofilmes são necessárias e a incorporação de moléculas e compostos a materiais de superfícies tem se mostrado como uma alternativa (ARTINI *et al.*, 2017). O extrato avaliado neste estudo apresentou atividade antibiofilme *in vitro* demonstrando sua potencialidade como fonte de obtenção de moléculas com interesse biotecnológico.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados neste estudo, podemos concluir :

- (a) Extratos aquosos obtidos a partir de resíduos agroindustriais de soja possuem importante atividade antibiofilme contra biofilmes estafilocócicos (*S. epidermidis* e *S. aureus*);
- (b) Proteínas parecem ser os componentes majoritários de E1, mas outros compostos incluindo flavonoides, fenólicos e taninos condensados estão também presentes no extrato;
- (b) As moléculas biologicamente ativas presentes em E1 podem ser de origem proteica;
- (c) E1 demonstra atividade antibiofilme nos estágios iniciais da adesão bacteriana e age de forma dose-dependente;
- (d) E1 diminui a hidrofobicidade celular bacteriana e pode inibir a formação de biofilmes de *S. epidermidis* através de um efeito físico;
- (e) A combinação de duas frações obtidas por ultracentrifugação com moléculas de massas moleculares <10 kDa e superiores a 50 kDa, inibiu fortemente o biofilme de *S. epidermidis* sugerindo que a atividade é dependente de um sinergismo de moléculas presentes em E1.
- (f) Tratamento agudo com E1 não causa efeitos tóxicos em *C. elegans*, mas a exposição crônica a este extrato, levou a um decréscimo na taxa de sobrevivência dos vermes .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Aennes et al. **Ecotoxicological impacts of surface water and wastewater from conventional and advanced treatment technologies on brood size, larval length, and cytochrome P450 (35A3) expression in *Caenorhabditis elegans*.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 14, p. 13868-13880, 2018.

AGYEI, Dominic. **Bioactive proteins and peptides from soybeans.** *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, v. 7, n. 2, p. 100-107, 2015.

ARCIOLA, C. R; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. **Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion.** *Nature Reviews Microbiology*, p. 1, 2018.

ARTINI, Marco et al. **Hydrophobin coating prevents *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation on different surfaces.** *Biofouling*, v. 33, n. 7, p. 601-611, 201

1

BLANES, P. S.; BORDONI, M. E.; GONZÁLEZ, J.C.; GARCÍA, S. I.; ATRIA, A. M.; SALA, L. F.; BELLÚ, S. E. **Application of soy hull biomass in removal of Cr(VI) from contaminated waters. Kinetic, thermodynamic and continuous sorption studies.** *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 4, p. 516-526, 2016.

BOIA, N.; PENTEADO, A. L.; DIAS, G.; PORTE, A.; KOBLITZ, M. G. B. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de soja contra patógenos transmitidos por alimentos.** *EMBRAPA Publicações*, 2013.

BOS, R.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. **Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study.** *FEMS microbiology reviews*, v. 23, n. 2, p. 179-230, 1999.

BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. **Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 3, p: 652-659, 2006.

BRACHFELD, A.; CHOATE, M. **Eat your food. Gastronomical glory from garden to gut: a Coastalfields cookbook, nutrition textbook, farming manual and sports manual.** Coastalfields. Arvada, CO, USA, p. 275, 2007.

BROGDEN, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238, 2005.

BURMØLLE, Mette et al. **Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections.** *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 324-336, 2010.

CÉSAR, I. D. C et al. **Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência**

(CLAE). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 4, p. 616-625, 2007.

CHATTERJEE, C.; GLEDDIE, S.; XIAO, CW. **Soybean bioactive peptides and their functional properties**. *Nutrients*, v. 10, n. 9, p. 1211, 2018.

CHEN, K. I.; ERH, M. H.; SU, N. W.; LIU, W. H.; CHOU, C. C.; CHENG, K. C. **Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications**. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 96, n. 1, p. 9-22, 2012.

CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D.T. **Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy**. *Nature Chemical Biology*, n. 3, p. 541–548, 2007.

CONAB (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 4 Safra 2016/17 - Quarto levantamento**, Brasília, p. 1-160, 2017.

CORTÉS, M. E; BONILLA, J. C.; SINISTERRA, R. D. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research Technology and Advances**, v. 2, p. 896-905, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DARBY, C.; HSU, J. W.; GHORI, N.; FALKOW, S. **Caenorhabditis elegans: plague bacteria biofilm blocks food intake**. *Nature*, 417(6886), 243-244, 2002.

DAROUICHE, Rabi O. **Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence**. *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, n. 9, p. 1567-1572, 2001.

DAVIES, David. **Understanding biofilm resistance to antibacterial agents**. *Nature reviews Drug discovery*, v. 2, n. 2, p. 114, 2003.

DELEO F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B.N; CHAMBERS, H. F. **Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Lancet*. v. 375, n. 9725, p. 1557–1568, 2010.

DEPUYDT, Geert et al. **LC–MS proteomics analysis of the insulin/IGF-1-deficient *Caenorhabditis elegans* daf-2 (e1370) mutant reveals extensive restructuring of intermediary metabolism**. *Journal of proteome research*, v. 13, n. 4, p. 1938-1956, 2014.

DIARD, M. et al. ***Caenorhabditis elegans* as a simple model to study phenotypic and genetic virulence determinants of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli***. *Microbes and infection*, v. 9, n. 2, p. 214-223, 2007.

DUNNE, W.M. **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, p. 155-166, 2002.

FARROKHI, N.; WHITELEGGE, J. P.; BRUSSLAN, J. A. **Plant peptides and peptidomics.** *Plant biotechnology journal*, v. 6, n. 2, p. 105-134, 2008.

FREITAS, C, et al. **Recovery of Antimicrobials and Bioaccessible Isoflavones and Phenolics from Soybean (*Glycine max*) Meal by Aqueous Extraction.** *Molecules*, v. 24, n. 1, p. 74, 2019.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. **Biofilms: an emergent form of bacterial life.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, p. 563-575, 2016.

FLEMMING, H-C; WINGENDER, J. **The biofilm matrix.** *Nature reviews. Microbiology*, v. 8, n. 9, p. 623, 2010.

FRIEDMAN, Mendel; BRANDON, David L. **Nutritional and health benefits of soy proteins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.

GALIÈ, Serena et al. *Biofilms in the food industry: health aspects and control methods.* *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 898, 2018.

GEMS, D; PARTRIDGE, L. **Stress-response hormesis and aging: “that which does not kill us makes us stronger”.** *Cell metabolism*, v. 7, n. 3, p. 200-203, 2008.

GHAHARI, S.; ALINEZHAD, H.; NEMATZADEH, G. A.; TAJBAKHSH, M.; BAHARFAR, R. **Chemical Composition, Antioxidant and Biological Activities of the Essential Oil and Extract of the Seeds of *Glycine max* (Soybean) from North Iran.** *Current microbiology*, v. 74, n. 4, p. 522-531, 2017.

GOULTER, R. M.; GENTLE, I. R.; DYKES, G. A. **Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example.** *Letters in applied microbiology*, v. 49, n. 1, p. 1-7, 2009.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. **Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection.** *Clinical Infectious Disease*, v. 46, p. 350–359, 2008.

GOVINDAN, Shanmugam et al. **Phytochemicals-induced hormesis protects *Caenorhabditis elegans* against α -synuclein protein aggregation and stress through modulating HSF-1 and SKN-1/Nrf2 signaling pathways.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 102, p. 812-822, 2018.

GROSS, Matthias et al. **Key role of teichoic acid net charge instaphylococcus aureus colonization of artificial surfaces.** *Infection and immunity*, v. 69, n. 5, p. 3423-3426, 2001.

- GUANG, C.; CHEN, J.; SANG, S.; CHENG, S. **Biological functionality of soyasaponins and soyasapogenols**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 33, p. 8247-8255, 2014.
- GUO, Y.; YANG, Y.; WANG, D. **Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages**. *Reproductive Toxicology*, v. 28, n. 1, p. 90-95, 2009.
- GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. **Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review**. *Archives of Microbiology*, Jan;198(1):1-15, 2016.
- HALL, Kevin D. et al. **Calorie for calorie, dietary fat restriction results in more body fat loss than carbohydrate restriction in people with obesity**. *Cell metabolism*, v. 22, n. 3, p. 427-436, 2015.
- HAN, Xue et al. **Investigating the performance of three modified activated sludge processes treating municipal wastewater in organic pollutants removal and toxicity reduction**. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 148, p. 729-737, 2018.
- HENGGE, R. **Principles of c-di-GMP signaling in bacteria**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 263-273, 2009.
- HO, D. P.; NGO, H. H.; GUO, W. **A mini review on renewable sources for biofuel**. *Bioresource technology*, v. 169, p. 742-749, 2014.
- HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. **Antibiotic resistance of bacterial biofilms**. *International journal of antimicrobial agents*, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.
- HØIBY, Niels. **A short history of microbial biofilms and biofilm infections**. *Apmis*, v. 125, n. 4, p. 272-275, 2017.
- HONG, Hyunki et al. **Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein**. *Journal of basic microbiology*, v. 46, n. 4, p. 329-335, 2006.
- HSIEH, C.; YANG, F-C. **Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum***. *Bioresource Technology*, v. 91, n. 1, p. 105-109, 2004.
- JAMAL, Muhsin et al. **Bacterial biofilm and associated infections**. *Journal of the Chinese Medical Association*, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.
- JENKINS, A.; DIEP, B. A.; MAI, T. T.; VO, N. H.; WARRENER, P.; SUZICH, J.; STOVER, C. K.; SELLMAN, B. R. **Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease**. *MBio*, v. 6, n. 1, p. e02272-14, 2015.
- KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. **Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism**. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 5, n. 5, p. 387, 2006.

- KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R. **New approaches for treating staphylococcal biofilm infections.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1241, n. 1, p. 104-121, 2011.
- KILARA, A. & V. R. HARWALKAR. **Denaturation.** Pages 71– 165 in *Food Proteins: Properties and Characterization*. S. Nakai and H. W. Modler, ed. VCH Publishers, New York, 1996.
- KOO, Hyun et al. **Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, n. 12, p. 740, 2017.
- KUMAR, Ashutosh et al. **Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens.** *International Journal of Medical Microbiology*, v. 307, n. 8, p. 481-489, 2017.
- LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. **From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections.** *Pathogens*, v. 2, n. 2, p. 288- 356, 2013.
- LEE, Jeong-Sook. **Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Life sciences*, v. 79, n. 16, p. 1578-1584, 2006.
- LEMAITRE, B.; AUSUBEL, F. M. **Animal models for host-pathogen interactions.** *Current Opinion in Microbiology*, jun;11(3):249-50, 2008.
- LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; EGEA, M. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. **Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agro- industrial by-products.** *Bioresource technology*, v. 222, p. 210-216, 2016.
- LEWIS, K. **Riddle of biofilm resistance.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.
- LI, B.; LOGAN, B. E. **Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces.** *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 36, n. 2, p. 81-90, 2004.
- LI, S.; ZHU, D.; LI, K.; YANG, Y.; LEI, Z.; ZHANG, Z. **Soybean curd residue: composition, utilization, and related limiting factors.** *ISRN Industrial Engineering*, 2013.
- LOCKE, Adam E. et al. **Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology.** *Nature*, v. 518, n. 7538, p. 197, 2015.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. **Biofilms.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, p. 1-11, 2010.
- LUDEWIG, A. H. et al. **Larval crowding accelerates *C. elegans* development and reduces lifespan.** *PLoS genetics*, v. 13, n. 4, p. e1006717, 2017.
- LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. **Lung infections associated with cystic fibrosis.** *Clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 2, p. 194-222, 2002.

- MA, Heran *et al.* **A novel peptide from soybean protein isolate significantly enhances resistance of the organism under oxidative stress.** *PloS one*, v. 11, n. 7, p. e0159938, 2016.
- MACNEIL, L. T. *et al.* **Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*.** *Cell*, v. 153, n. 1, p. 240-252, 2013.
- MAHAMI, T.; ADU-GYAMFI, A. **Biofilm-associated infections: public health implications.** *Inter. Res. J. Microbiol*, v. 2, n. 10, p. 375-381, 2011.
- MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G; ANDRIKOPOULOS, N. K. **Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts.** *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.
- MATTILA-SANDHOLM, T. & WIRTANEN, G. **Biofilm formation in the industry: a review.** *Food Reviews International*, v. 8, n. 4, p. 573-603, 1992.
- MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. **Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais.** *Ciência Rural*, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.
- MESSINA, Mark. **Soy and health update: evaluation of the clinical and epidemiologic literature.** *Nutrients*, v. 8, n. 12, p. 754, 2016.
- MILLER, M.; BASSLER, B. **Quorum sensing in bacteria.** *Annual Review of Microbiology*, v. 5, p. 165-199, 2001.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica.** 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- MUSSATTO, S.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. **Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes.** In: YEOW, S.K.; XINXIN, G. *Industrial Waste, InTech* (2012).
- NETO, W. P. F.; SILVÉRIO, H. A.; DANTAS, N. O.; PASQUINI, D. **Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls.** *Industrial crops and products*, v. 42, p. 480-488, 2013.
- NG, T. B.; YE, X. J.; WONG, J. H.; FANG, E. F.; CHAN, Y. S.; PAN, W.; YE, X. Y.; SZE, S. C. W.; ZHANG, K. Y.; LIU, F.; WANG, H. X. **Glyceollin, a soybean phytoalexin with medicinal properties.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 90, n. 1, p. 59-68, 2011.
- NIGAM, P. S.N. **Production of Organic Acids from Agro-Industrial Residues.** In: NIGAM, P. S.N; PANDEY, A. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation.* Springer, 2009.
- NIH. National Institutes of Health. USA, 2002. Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>. Acesso: fevereiro/2019

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. **Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives.** *Recent patents on anti-infective drug discovery*, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2012.

NYA, E. **Biofilms and biofouling: cost and effect on drinking water quality for human development.** *J. Glob. Biosci*, v. 4, p. 1571-1578, 2015.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. **Biofilm formation as microbial development.** *Annual Reviews in Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

OTTO, M. ***Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen.** *Nature reviews Microbiology*, v. 7, n. 8, p. 555, 2009.

PARK, H.E.H.; JUNG, Y.; LEE, S.J.V. **Survival assays using *Caenorhabditis elegans*.** *Molecules and cells*, v. 40, n. 2, p. 90, 2017.

PERCIVAL, Steven L. et al. **Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control.** *Journal of medical microbiology*, v. 64, n. 4, p. 323-334, 2015.

PIRES, D. P. et al. **Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections.** *Current opinion in microbiology*, v. 39, p. 48-56, 2017.

PONNUSHA, B. S.; SUBRAMANIYAM, S.; PASUPATHI, P. **Antioxidant and antimicrobial properties of *Glycine max*-A review.** *International Journal Current Biomedical Science*, v. 1, n. 2, p. 49-62, 2011.

POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J. H. **Food Science**, Ed. 5. New York: Ed.; Chapman & Hall, 608 p, 1997

QUIRYNEN, Marc et al. **The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation: an in vivo study in man.** *Journal of clinical periodontology*, v. 17, n. 3, p. 138-144, 1990.

RAINEY, N. et al. **Curcumin hormesis mediates a cross-talk between autophagy and cell death.** 2015. *Cell death & disease* 6:e2003.

RATTAN, Suresh IS. **Hormesis in aging.** *Ageing research reviews*, v. 7, n. 1, p. 63-78, 2008.

ROCHELLE, S. L.; SARDI, J. D. C. O.; FREIRES, I. A.; DE CARVALHO GALVÃO, L. C.; LAZARINI, J. G.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P.L. **The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens.** *Industrial Crops and Products*, v. 87, p. 150-160, 2016.

RÖMLING, U. et al. **Microbial biofilm formation: a need to act.** *Journal of internal medicine*, v. 276, n. 2, p. 98-110, 2014.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. **Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais–II SIGERA**, v. 15, 2011.

SHAH, A. R.; GOYAL, R. K. **Current status of the regulation for medical devices.** *Indian journal of pharmaceutical sciences*, v. 70, n. 6, p. 695, 2008.

SIFRI, C. D.; BEGUN, J.; AUSUBEL, F. M. **The worm has turned—microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*.** *Trends in microbiology*, v. 13, n. 3, p. 119-127, 2005.

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

SINGH, B. P; VIJ, S.; HATI, S. **Functional significance of bioactive peptides derived from soybean.** *Peptides*, v. 54, p. 171-179, 2014.

SITOHY, M. Z.; MAHGOUB, S. A.; OSMAN, A. O. **In vitro and in situ antimicrobial action and mechanism of glycinin and its basic subunit.** *International journal of food microbiology*, v. 154, n. 1-2, p. 19-29, 2012.

SREY, S; JAHID, I. K.; HA, S-D. **Biofilm formation in food industries: a food safety concern.** *Food Control*, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.

STRYJEWSKI, M. E.; SEXTON, D. J. ***Pseudomonas aeruginosa* infections in specific types of patients and clinical settings.** In: *Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa*. Springer, Boston, MA, 2003. p. 1-15.

SUD, D.; MAHAJAN, G.; KAUR, M.P. **Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions – A review.** *Biosource Technology*, v. 99, p.6017-6027, 2008.

SUN, Fengjun et al. **Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies.** *Future microbiology*, v. 8, n. 7, p. 877-886, 2013.

SZEWCYK, Nathaniel J. et al. **Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in *C. elegans* under dietary restriction.** *Journal of experimental biology*, v. 209, n. 20, p. 4129-4139, 2006.

TEJEDA-BENITEZ, L; OLIVERO-VERBEL, J. ***Caenorhabditis elegans*, a biological model for research in toxicology.** In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237*. Springer, Cham, 2016. p. 1-35.

TEJEDA-BENÍTEZ, Lesly et al. **Toxicity profile of organic extracts from Magdalena River sediments.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 2, p. 1519-1532, 2018.

TRENTIN, D.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. **Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate.** *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

- TYUG, T. S.; PRASAD, K. N.; ISMAIL, A. **Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products.** *Food Chemistry*, v. 123, p. 583-589, 2010.
- VANDAMME, E. J. **Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products.** In: NIGAM, P. S.N; PANDEY, A. *Biotechnology for Agro- Industrial Residues Utilisation.* Springer, 2009.
- VAN DER MEI, H. C.; WEERKAMP, A. H.; BUSSCHER, H_J. **A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of streptococcal cell surfaces.** *Journal of microbiological methods*, v. 6, n. 5, p. 277-287, 1987.
- VAN OSS, C. J.; GOOD, R. J.; CHAUDHURY, M. K. **The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces.** *Journal of colloid and Interface Science*, v. 111, n. 2, p. 378-390, 1986.
- VELMOUROUGANE, K; PRASANNA, R; SAXENA, A. K.. **Agriculturally important microbial biofilms: present status and future prospects.** *Journal of basic microbiology*, v. 57, n. 7, p. 548-573, 2017.
- VILLALOBOS, M. del C. et al. **Antioxidant and antimicrobial activity of natural phenolic extract from defatted soybean flour by-product for stone fruit postharvest application.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 96, n. 6, p. 2116-2124, 2016.
- WANG, B.; MUIR, T. W. **Regulation of virulence in *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms and remaining puzzles.** *Cell Chemical Biology*, v. 23, n. 2, p. 214-224, 2016.
- WANG, Y.; LEE, S. M.; DYKES, G. **The physicochemical process of bacterial attachment to abiotic surfaces: Challenges for mechanistic studies, predictability and the development of control strategies.** *Critical reviews in microbiology*, v. 41, n. 4, p. 452-464, 2015.
- WATSON, Emma et al. **Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits.** *Cell*, v. 156, n. 4, p. 759-770, 2014.
- WATTERS, C. et al. **Host responses to biofilm.** In: *Progress in molecular biology and translational science.* Academic Press, 2016. p. 193-239.
- WOICIECHOWSKI, A. L. et al. **Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares.** *Chapter in Biotecnologia de alimentos, coleção Ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte*, v. 12, p. 143-172, 2013.
- WOLF, Walter J. **Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 18, n. 6, p. 969-976, 1970.
- WRIGHT, G. D. **Q&A: Antibiotic resistance: what more do we know and what more can we do?** *BMC Biology*, v. 11, n. 1, p. 51, 2013.

WU, H.; MOSER, C.; WANG, H. Z.; HØIBY, N.; SONG, Z. J. **Strategies for combating bacterial biofilm infections.** *International journal of oral science*, v. 7, n. 1, p. 1, 2015.

XIANG, Ning et al. **Effect of physicochemical properties of peptides from soy protein on their antimicrobial activity.** *Peptides*, v. 94, p. 10-18, 2017.

XIAO, Chao Wu. **Health effects of soy protein and isoflavones in humans.** *The Journal of nutrition*, v. 138, n. 6, p. 1244S-1249S, 2008.

ZARKADAS, C.G.; GAGNON, C.; GLEDDIE, S.; KHANIZADEH, S.; COBER, E.R.; GUILLEMETTE, R.J.D. **Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis.** *Food Research International*, v.40, p.129-146, 2007.

ZHANG, Chao et al. **Hormetic effect of panaxatriol saponins confers neuroprotection in PC12 cells and zebrafish through PI3K/AKT/mTOR and AMPK/SIRT1/FOXO3 pathways.** *Scientific reports*, v. 7, p. 41082, 2017.