

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR ISOLADOS DO GÊNERO *Botryosphaeria*.

Nilson Kobori Monteiro, Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva, Ana Flora Dalberto Vasconcelos, Ariana Martins Vilela de Oliveira, Marilsa de Stefani Cardoso, Aneli de Melo Barbosa. – Bioquímica – Licenciatura em Química – Departamento de Física, Química e Biologia – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Campus de Presidente Prudente.

Os polissacarídeos microbianos têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de uso em uma ampla variedade de áreas industriais, podendo ser aplicados como imunomoduladores, emulsificantes, estabilizantes ou biofilmes. Alguns exopolissacarídeos (EPS), como os do tipo α e β -glucanas, já são aceitos e aplicados biotecnologicamente, enquanto outros ainda estão em fase de estudo. O uso de cada polímero varia bastante, mas existe um grande interesse nesses compostos como potenciais substitutos das gomas derivadas de plantas ou algas marinhas (SUTHERLAND, 1998).

Embora alguns EPS tenham sido descritos, nem todos foram ainda caracterizados. Conseqüentemente, sua diversidade química e propriedades funcionais ainda são pouco entendidas. Diferentes técnicas são utilizadas para caracterização destes biopolímeros, que incluem cromatografia de filtração em gel, hidrólise ácida, metilação, degradação de Smith, análises por espectroscopia de infra-vermelho acoplado ao transformador de Fourier (FT-IR), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H e a cromatografia de gel permeação (GPC) para a determinação da massa molecular (GONZAGA *et al.*, 2005). Essas informações são importantes para a utilização dessas substâncias.

Fungos do grupo dos ascomicetos, como os do gênero *Botryosphaeria*, não são muito explorados quanto ao seu potencial de produção de exopolissacarídeos, principalmente no Brasil, onde a biodiversidade microbiana ainda é pouco aproveitada na área biotecnológica. Entretanto, para a utilização dessas moléculas, é importante, além de um bom microrganismo produtor, o isolamento, com subsequente purificação e análise estrutural das moléculas produzidas.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição em monossacarídeos, tipo de ligação e conformação estrutural dos EPS produzidos por isolados do gênero *Botryosphaeria*, obtidos de diferentes fontes vegetais (laranja, manga, graviola e pinha), denominados de EPS_{Laranja}, EPS_{MangaFruto}, EPS_{Graviola}, EPS_{Pinha} respectivamente, e do *Botryosphaeria rhodina* (EPS_{B. rhodina}), microrganismo de referência neste trabalho, quando cultivados em sacarose comercial como única fonte de carbono, utilizada devido ao seu baixo custo e fácil obtenção.

A produção dos EPS foi realizada segundo a metodologia descrita por Steluti e col. (2004) com alíquotas de cada material sendo quantificadas para açúcares totais (método de Dubois), redutores (método de Somogyi-Nelson) e proteínas (método de Bradford) (CORRADI DA SILVA *et al.*, 2005).

Para a determinação da composição monossacarídica, uma porção de cada material (50 μg) foi submetida à hidrólise ácida total com TFA 5M por 16 horas a 100°C e após remoção total do ácido, analisadas por HPAEC/PAD. Para a determinação das ligações glicosídicas que compõem o EPS foram feitos espectros de FT-IR. A estrutura conformacional, importante dado para aplicação biológica, foi analisada através do ensaio com o corante Congo Red (complexo CR/EPS) que consiste no deslocamento do comprimento de onda máximo (λ_{MAX}) causado pela interação do corante com a estrutura conformacional da molécula, na presença de diferentes concentrações de NaOH (0,1 a 0,5M).

Os resultados observados nas quantificações de açúcares totais, redutores e proteínas para quase todos os isolados (Tabela 1), com exceção do EPS_{MangaFruto}, demonstraram uma concentração significativa de EPS e baixo percentual de açúcares redutores e ainda que a fonte de carbono utilizada (sacarose) não apresente característica redutora, poderia estar sendo biologicamente degradada, gerando açúcares redutores. A quantificação de proteínas forneceu valores muito baixos quando comparados à massa total, podendo ser atribuída à presença de uma glicoproteína secretada no meio de cultivo, denominada lacase, produzida constitutivamente pelo *B. rhodina* (DEKKER & BARBOSA, 2001).

TABELA 1: Peso seco (liofilizado) e quantificações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas dos EPS produzidos pelos isolados de botriosferáceos obtidos de diferentes fontes vegetais (laranja, manga, graviola, pinha) e do *B. rhodina*, crescidos em sacarose comercial como única fonte de carbono.

	Peso Seco (g)	Açúcar Total (g)	Açúcar Redutor (g)	Proteínas (g)
EPS _{Manga}	0,338	0,319	0,007	0,019
EPS _{Laranja}	1,800	1,791	0,010	0,009
EPS _{Graviola}	1,542	1,477	0,013	0,065
EPS _{Pinha}	1,312	1,294	0,014	0,018
EPS _{<i>B. rhodina</i>}	1,136	1,085	0,019	0,051

A estrutura primária de um EPS é definida pela sua composição monossacarídica, a seqüência do tipo de anel dos monossacarídeos constituintes, tipo de ligação glicosídica, entre outras características (PAZUR, 1994). A análise dos hidrolisados por HPAEC/PAD (Figura 1) mostrou a predominância de glucose como monômero base das moléculas, portanto os EPS produzidos são glucanas.

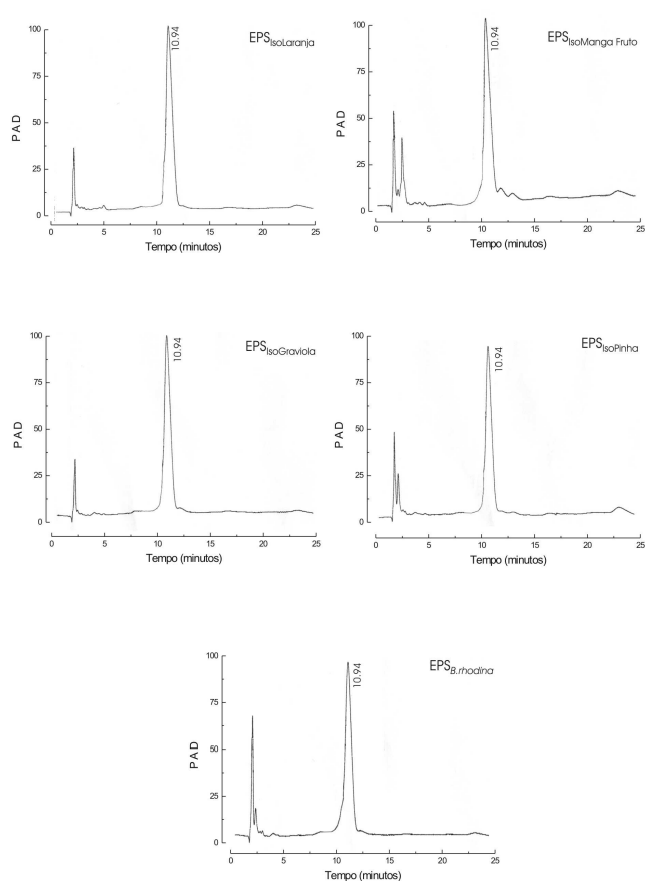


Figura 1: Análise dos hidrolisados de EPS produzidos pelos diferentes isolados de botriosferáceos e pelo *B. rhodina* por HPAEC/PAD. Condições da corrida: isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA10. Condições de hidrólise: TFA 5M, 16 horas, 100 °C. Quantidade de material: 50 µg. Tempo de 10.94 corresponde ao padrão de glucose.

Espectros de FT-IR de todos os EPS produzidos foram realizados para determinar quais tipos de ligação glicosídicas unem os monômeros de glucose. Os resultados obtidos (Figura 2) demonstraram bandas de absorção em 891 cm^{-1} e 1371 cm^{-1} , que são características de ligações β e de β -glucanas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1996), respectivamente. Estas bandas indicam a presença de ligações glicosídicas em configuração β nos diferentes isolados de botriosferáceos e do *B. rhodina*. A ausência de banda em 843 cm^{-1} indica que ligações com configuração em α não estão presentes nas moléculas. A ausência de absorção em 1535 cm^{-1} , atribuída ao agrupamento amida, sugere a não existência de proteínas em quantidades consideráveis nas amostras analisadas. As bandas em 1150 , 1110 e 1040 cm^{-1} são típicas de resíduos de glucose (GUTIÉRREZ *et al.*, 1996). Estes resultados demonstraram que EPS produzidos pelos isolados de *Botryosphaeria* são do tipo β -glucanas.

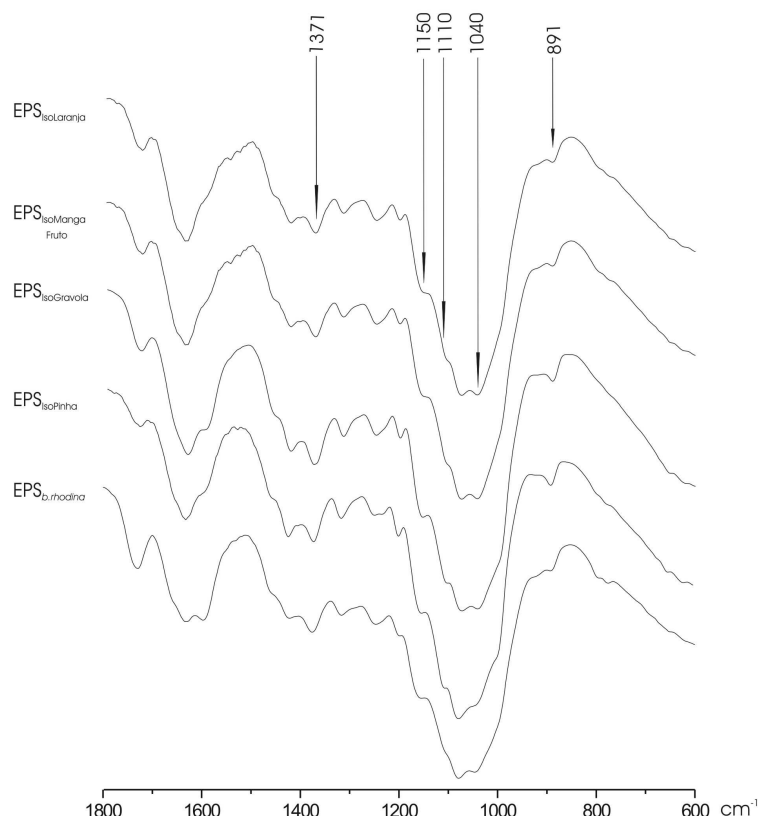


Figura 2: Espectro de infravermelho acoplado ao transformador Fourier (região de 1800 a 600 cm^{-1}) dos EPS produzidos pelos diferentes isolados de botriosferáceos e pelo *B. rhodina*.

Outra informação importante para a aplicação em algumas áreas, como a medicinal por exemplo, é a conformação adotada pela molécula em soluções aquosas. Entre as possíveis estruturas encontradas, a tripla hélice é a que apresenta a melhor resposta biológica (MUELLER *et al.*, 2000).

Segundo Ogawa e colaboradores (1972), com concentrações entre $0,01$ e $0,19\text{M}$ de NaOH existe uma perda gradual da rigidez da estrutura, reduzindo a viscosidade, o que facilitaria a complexação com o Congo Red. Com concentrações entre $0,19$ a $0,24\text{M}$ ocorre a quebra das pontes de hidrogênio, dando início a transição da conformação helicoidal para a randômica, perdendo assim a capacidade de formar complexos com o corante. Em concentrações acima de $0,24\text{M}$ existe predominância de conformações randômicas.

A relação entre complexo CR/EPS, conformação e pH pode ser acompanhada pela mudança do comprimento de onda máximo (λ_{MAX}) em cada uma das concentrações de NaOH (Figura 3). Pode-se ver que dentre os cinco EPS analisados, o que apresentou um maior deslocamento de λ_{MAX} foi o EPS_{Laranja}, sugerindo que em sua estrutura existe uma maior porção tripla hélice que nos demais isolados. Os EPS_{graviola} e EPS_{Pinha} apresentam resultados semelhantes ao EPS_{B. rhodina}, sugerindo assim que suas conformações são similares. O EPS_{MangaFruto} manteve certa linearidade com a variação do pH, mas com um valor superior aos do padrão de dextrana (não causando deslocamento do λ_{MAX}) e do

controle com Congo Red, o que pode ser explicado por uma maior quantidade de hélice simples que não contribui para a formação do complexo.

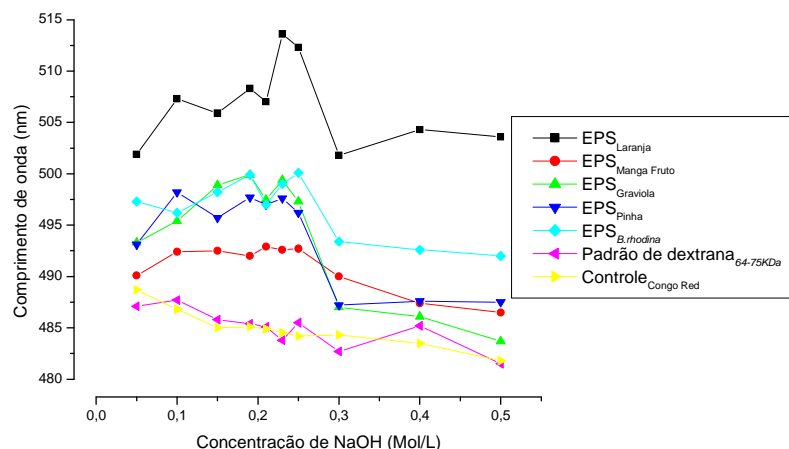


Figura 3: Análise conformacional dos diferentes isolados de botriosferáceos.

Portanto, estes resultados indicaram que existe entre os isolados analisados um bom potencial para produção de exopolissacarídeos do tipo β -glucanas. Os resultados de conformação também demonstraram que o EPS_{Laranja} possui estrutura em tripla hélice, o que poderá facilitar futuros estudos de atividade biológica deste polímero.

Para a confirmação dos resultados de estrutura, bem como para determinar tipo de ramificação das moléculas produzidas, outras análises de rotina da química de carboidratos ainda serão realizadas, tais como metilação, degradação de Smith e ressonância magnética, para posterior aplicação do biopolímero do melhor produtor escolhido.

Referências Bibliográficas

- CORRADI DA SILVA, M. L.; IZELI, N. L.; MARTINEZ, P.F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, G. V. J.. Purification and structural characterization of (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 10-17, 2005.
- DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.81-88, 2001.
- GONZAGA, M.L.C.; RICARDO, N.M.P.S.; HEATLEY, F.; SOARES, S.A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydrate Polymers**, v.60, p.43-49, 2005.
- GUTIÉRREZ, A.; BOCCHINI, P.; GALLETTI, G.; MARTINEZ, A.T. Analysis of ligninpolysaccharide complexes formed during grass lignin degradation by cultures of *Pleurotus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1928-1934, 1996.
- MUELLER, A.; RAPTIS, J.; RICE, P.J.; KALBFLESCHE, J.H.; STOUT, R.D.; ENSLEY, H.E.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D.L. The Influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1,3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology**, v.10, p. 339-346, 2000.
- OGAWA, K.; WATANABE, T.; TSURUGI, J.; ONO, S. Conformational behaviour of a gel-forming (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan in alkaline solutions. **Carbohydrate Research**, v.23, p.399-405, 1972.
- PAZUR, J.H. Neutral Polysaccharides. In: M.F. Chaplin and J.F. Kennedy (Eds) **Carbohydrate analysis: A practical approach**. 2.ed. Oxford -U.K.: Oxford University press, p.181-229, 1994.
- SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech January**, v.16, p.41-46, 1998.
- STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGATTO, M. M.; SUMEIJIA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.. Comparison of botryosphaeran production by the ascomycetes fungus *Botryosphaeria* sp, grown on different carbohydrate carbon sources and their partial structural features. **Journal Basic Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.