

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS PRESENTES NA PAREDE CELULAR DO *Botryosphaeria rhodina*.

Andreza Cândido Matias, Maria de Lourdes Corradi da Silva, Eliane Kaori Fukuda, Nilson Kobori Monteiro, Gabriel Aranda Selverio, Aneli de Melo Barbosa, – Bioquímica – Licenciatura em Química – Departamento de Física, Química e Biologia – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Campus de Presidente Prudente.

Com a descoberta de microrganismos capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares, pesquisas têm se voltado para o cultivo destes com o interesse de conhecer a composição química e estrutura da parede celular desse microrganismo (SEVIOUR *et al.* 1992, SELBMANN, *et al.*, 2002, KIM *et al.*, 2003). A parede celular é uma estrutura rígida, essencial para a sobrevivência do fitopatógeno, e o conhecimento da estrutura química de seus componentes polissacarídicos poderá ser útil para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, que poderão inibir a biossíntese e/ou alterar a estrutura da parede celular, bem como obtenção de matéria-prima para aplicação na indústria cosmético-farmacêutica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi extrair e purificar algumas frações ricas em açúcares utilizando a biomassa micelial do fitopatógeno *Botryosphaeria rhodina*.

O fitopatógeno *B. rhodina*, foi cultivado em glucose como única fonte de carbono (STELUTI *et al.*, 2004). O cultivo foi interrompido por centrifugação obtendo-se o sobrenadante contendo exopolissacarídeos e o precipitado contendo a biomassa.

Para obtenção desses polissacarídeos a biomassa foi lavada com água, exaustivamente, até que nenhum resíduo de açúcar livre fosse detectado pelo ensaio do fenol-ácido sulfúrico, garantindo a total remoção do EPS. A massa micelial foi liofilizada, fragmentada e submetida, consecutivamente, a três diferentes procedimentos extrativos: água fria (3x), água fervente (4x) e hidróxido de potássio a 2%, 100°C (2x). Os extratos de cada uma das extrações foram separados de seus respectivos resíduos por filtração e centrifugação. Em seguida, foram reduzidos a pequeno volume sob baixa pressão, em evaporador rotativo e então refrigerados a 4°C. Os extratos concentrados foram precipitados em etanol absoluto e após centrifugação e solubilização em água, tiveram alíquotas retiradas para dosagem de proteínas e açúcares totais. Alíquotas de todas as etapas de extração e purificação foram hidrolisados para açúcares neutros com TFA 5,0M, 16 horas a 100 °C e, aminados com TFA 2,0 M, 1 hora a 121°C e analisadas por HPAEC/PAD. (CORRADI DA SILVA *et al.*, 2005).

Os resultados observados nos precipitados etanólicos, demonstraram que as extrações aquosas a frio (F₂ e F₃) e a primeira extração aquosa a quente (Q₁) apresentaram grande quantidade de açúcar total de 93%, 93% e 99%, respectivamente e um maior percentual de proteínas de 07%, 07% e 06%. As demais extrações a quente e alcalina, apresentaram uma alta concentração de açúcar, porém com menor proporção de proteína. Os resultados da hidrólise ácida mostraram que galactose (Tabela 1) é o açúcar majoritário nos quatro primeiros extratos (F₁, F₂, F₃ e Q₁) e a glucose nos demais.

Selecionou-se para dar continuidade aos estudos, as primeiras extrações, aquosa a quente (Q₁) e alcalina a quente (K₁) não só por serem quantitativamente majoritárias em seus respectivos extratos, mas também pela grande diferença percentual de seus constituintes monossacarídicos. A fração Q₁, rica em galactose, foi aplicada à coluna de filtração em gel Sepharose CL-4B. De acordo com o princípio do método o material eluiu como quatro picos, em ordem decrescente de massa molecular, denominados sub-frações A, B, C e D (Figura 1), que foram submetidos à hidrólise ácida obtendo as composições percentuais indicados na Tabela 2. A fração K₁, rica em glucose, foi submetida ao gelo e degelo, até que nenhum precipitado fosse detectado no sobrenadante do degelo. Este procedimento rendeu duas frações denominadas de K₁S (solúvel) e K₁P (precipitado) que também foram submetidos à hidrólise ácida (Tabela 2).

As frações A, B, C e D, provenientes de Q₁, bem como K₁S e K₁P, provenientes de K₁ foram analisados por FT-IR, na forma de pastilhas de KBr. Os resultados dessa análise, mostrados na figura 2, indicam uma banda de absorção de 834 cm⁻¹ para a sub-fração A, que corresponde a presença de ligação glicosídica do tipo α (MOHACEK-GROSEV *et al.*, 2001). As demais sub-frações (B, C e D) apresentaram, também uma banda em 880 cm⁻¹ atribuída à ligação β. O mesmo comportamento foi verificado na fração solúvel (K₁S) obtida no extrato alcalino. K₁P, rica em glucose, apresentou um

único sinal em 890 cm⁻¹, sugerindo a existência de uma β -glucana provavelmente pura. (GUTIÉRREZ *et al.*, 1996).

Tabela 1: Composição percentual dos açúcares neutros obtidos por hidrólise ácida* nos diferentes extratos da biomassa do fitopatógeno *Botryosphaeria rhodina* por HPAEC/PAD.

| Frações | Fucose (%) | Galactose (%) | Glucose (%) | Manose (%) |
|----------------|---------------|------------------|----------------|---------------|
| F ₁ | 04 | 72 | 05 | 19 |
| F ₂ | 02 | 54 | 26 | 18 |
| F ₃ | 03 | 60 | 19 | 18 |
| Q ₁ | 03 | 57 | 27 | 13 |
| Q ₂ | 02 | 28 | 61 | 09 |
| Q ₃ | 01 | 23 | 68 | 08 |
| Q ₄ | 01 | 18 | 74 | 07 |
| K ₁ | 01 | 19 | 78 | 02 |
| K ₂ | 01 | 19 | 78 | 02 |

*Condições de hidrólise: TFA 5.0 M, 16 h, 100 °C ; Condições de análise: Isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos); Coluna: CarboPac PA1.

Tabela 2: Composição percentual dos açúcares neutros obtidos por hidrólise ácida* nas sub-frações dos extratos selecionados da biomassa do fitopatógeno *Botryosphaeria rhodina* por HPAEC/PAD.

| Sub-frações | Galactose (%) | Glucose (%) | Manose (%) |
|------------------|------------------|----------------|---------------|
| A | 20 | 64 | 16 |
| B | 66 | 14 | 20 |
| C | 83 | 05 | 12 |
| D | 67 | 25 | 08 |
| K ₁ S | 30 | 65 | 05 |
| K ₁ P | 7 | 93 | —----- |

*Condições de hidrólise: TFA 5.0 M, 16 h, 100 °C ; Condições de análise: Isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos); Coluna: CarboPac PA1.

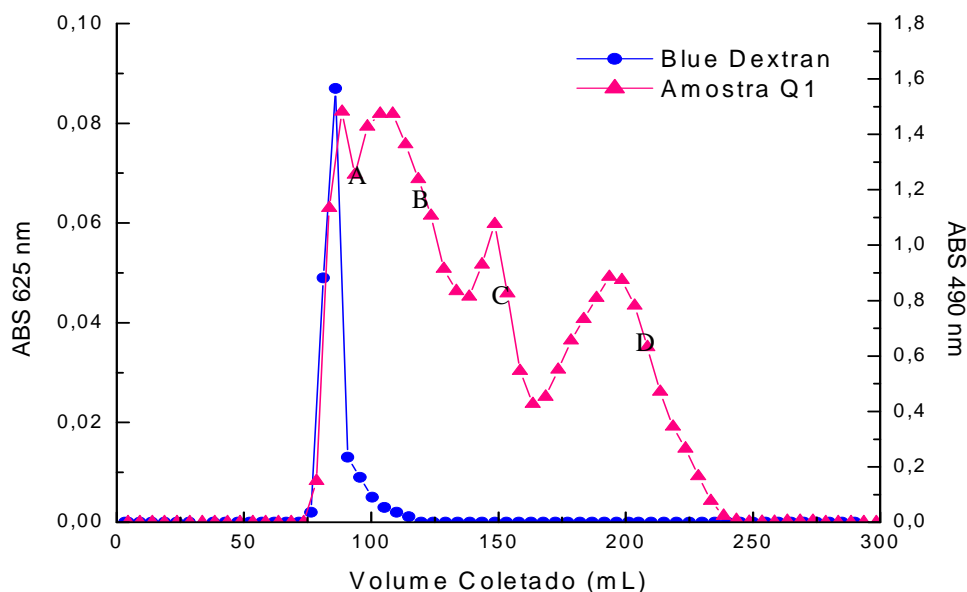


Figura 1: Cromatografia de filtração em gel Sepharose CL -4B da primeira extração a quente (Q_1) da biomassa do *B. rhodina*. Total de material aplicado: 10 mg; Fluxo: 1,2mL/min. Eluente: água; Fração: 5 mL; Volume da coluna: 225,7 mL.

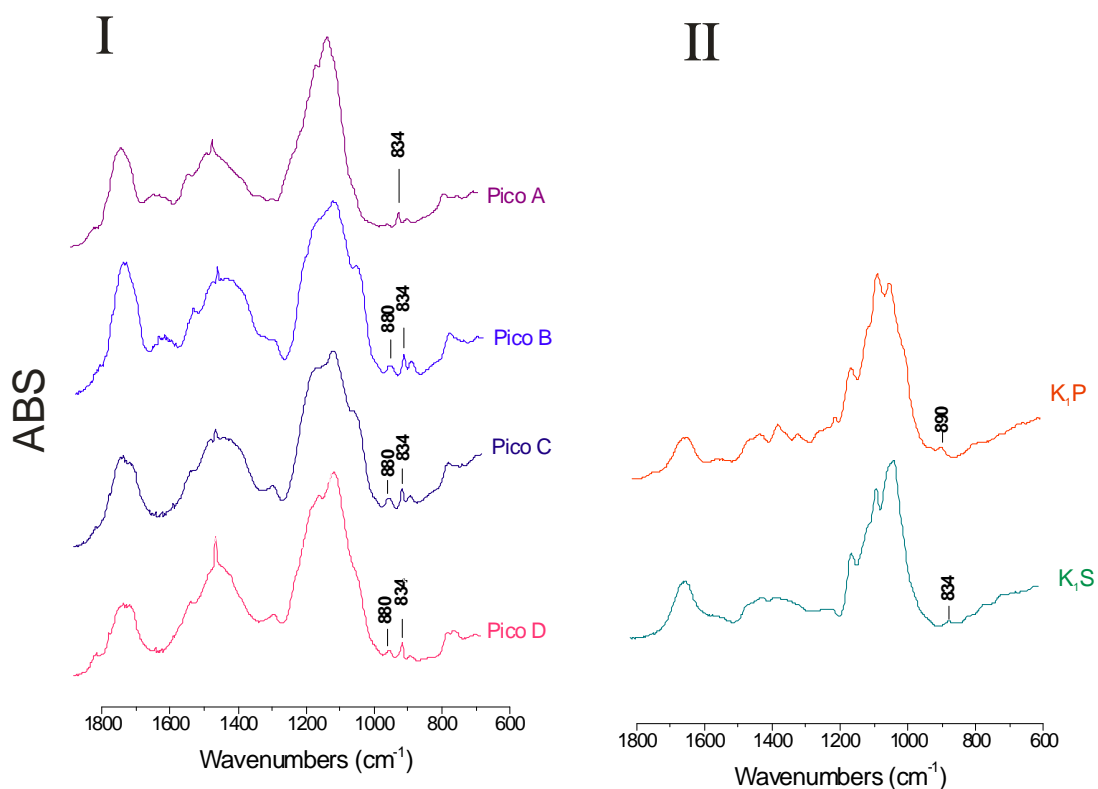


FIGURA 2: Espectro de infravermelho acoplado ao transformador Fourier (região de 1800 a 600 cm^{-1}) das subfrações das extrações a quente (I) e da extração alcalina (II) da biomassa micelial do ascomiceto *B. rhodina*. Pico A, Pico B, Pico C e Pico D: Frações obtidas da extração a quente após a filtração em gel CL-4B. K_1S e K_1P : Sobrenadante e precipitado da extração alcalina após o processo de gelo e degelo.

Portanto, de acordo com os resultados encontrados é possível observar que os diferentes procedimentos extrativos separam os polissacarídeos em classes, como as β - glucanas, provavelmente β , no extrato alcalino e as galactomananas ricas em galactose, no extrato aquoso a quente.

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 B.; DEKKER, R. F. H. 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 Research**, v.61, p. 10-17, 2005.

GUTIÉRREZ, A.; PRIETO, A.; MARTINEZ, A.T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, v.281, p.143-154, 1996A.

KIM, M-K.; RYU, K-E.; CHOI, W-A.; RHEE, Y-H.; LEE, I-Y. Enhanced production of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan by a mutant strain of *agrobacterium* species. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p.1-9, 2003.

SEVIOR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J.; AUER, D. P. F.; GIBBIS, P. A.; Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnonology**, v.12, p. 279-298, 1992.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, 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 ascomyceteous fungus *Botryosphaeria sp.*, grown on different carbohydrate carbon sources and their partial structural features. **Journal Basic Microbial**, v.44, p. 480-486, 2004.

MOHACEK-GROSEV, V.; BOZAC, R.; PUPPELS, G. J. Vibrational spectroscopic characterization of growing mushrooms and toadstools. **Spectrochimica Acta Part A**, v.57, p.2815-2829, 2001.