



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

**CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DO EXOPOLISSACARÍDEO
BOTRIOSFERANA PRODUZIDO PELO *Botryosphaeria rhodina*
MAMB-05 EM TRÊS FONTES DE CARBONO: GLUCOSE, FRUTOSE
E SACAROSE**

RAPHAEL ALVES MACEDO BONGIOVANI

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP
2008

RAPHAEL ALVES MACEDO BONGIOVANI

**CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DO EXOPOLISSACARÍDEO
BOTRIOSFERANA PRODUZIDO PELO *Botryosphaeria rhodina* MAMB-
05 EM TRÊS FONTES DE CARBONO: GLUCOSE, FRUTOSE E
SACAROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, Campus de São José do Rio Preto, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva
(UNESP/FCT - Presidente Prudente/SP)

Co-orientadora

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna
(UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto/SP)

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP
2008

RAPHAEL ALVES MACEDO BONGIOVANI

**CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DO EXOPOLISSACARÍDEO
BOTRIOSFERANA PRODUZIDO PELO *Botryosphaeria rhodina* MAMB-
05 EM TRÊS FONTES DE CARBONO: GLUCOSE, FRUTOSE E
SACAROSE**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a - Ana Lucia Barretto Penna

Professora Livre-Docente

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof^a Dr^a - Joana Lea Meira Silveira

Professora Associado I

Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. - Roberto da Silva

Professor Livre-Docente

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 02 de junho de 2008

Este trabalho é fruto do incentivo e amor que recebi principalmente de minha mãe Sonia Macedo, meus irmãos Brunno e Leonardo, pessoas fundamentais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Deus, que sempre esteve ao meu lado, guiando, sustentando e iluminando minha vida com tantas bênçãos, permitindo a concretização de mais uma etapa da minha vida.

À minha mãe, Sonia Alves Macedo pelo amor incondicional, apoio e compreensão. Mulher batalhadora pelos seus ideais! Você é meu principal incentivo e maior orgulho! Amo a Senhora!

Aos meus irmãos Brunno e Leonardo, pelo companheirismo e amor incondicional.

À minha esposa (Leticia) pelo carinho e apoio sempre. Agradeço a Deus pela sua presença na fase final deste trabalho. Pessoa muito especial na minha vida, e que hoje carrega nossa valiosa semente em sua barriguinha (Manuela), fonte de sonhos e de inúmeras felicidades.

Aos meus tios Neemias e Jane, que me receberam e me acolheram como um filho em S.J Rio Preto no início do mestrado. O meu muito obrigado!

À minha orientadora Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva, pela confiança e pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço pela sua orientação, supervisão, incentivo, ajuda e apoio demonstrados durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna pela Co-orientação deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Unesp - São José do Rio Preto.

À Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina-PR, pela colaboração na produção dos exopolissacarídeos.

À Profa. Dra. Joana Lea Meira Silveira, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração na realização das análises reológicas.

Aos colegas que fiz durante as etapas deste trabalho no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina-PR, e no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná - UFPR, que sempre se mostraram dispostos a me ajudar durante os experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Química de Carboidratos da UNESP de Presidente Prudente, em especial Nilson, Junior, Andreza, Técnica “Marilsa” e Profa. Ms. Ana Flora) pelo companheirismo, incentivo e ajuda indispensável para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!

Tatiana “TATI” por ter me ajudado nos estudos quando estava com dúvidas, e por sempre ser uma grande e maravilhosa amiga.

À Regina, Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente, grande incentivadora para minha entrada no Mestrado.

Ao meu amigo Paulo pelo incentivo e as inúmeras orações.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram na realização deste trabalho.

“Nunca diga a Deus o tamanho do seu problema; diga ao seu problema o tamanho do seu Deus”.

Autor desconhecido

Fonte: <http://pensamentos.prati.com.br>

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros produzidos por uma grande variedade de microrganismos e podem possuir propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes. Considerando o interesse crescente das indústrias na busca de polissacarídeos que apresentem comportamento reológico compatível com sua aplicação, tanto nos setores de alimentos como farmacêutico, cosmético e têxtil, pesquisas vêm sendo realizadas com a esperança da descoberta de novas moléculas promissoras para tais aplicações. O objetivo deste trabalho foi determinar as características reológicas do exopolissacarídeo (botriosferana) produzido pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em três fontes de carbono: glucose (EPS_{GLU}), sacarose (EPS_{SAC}) e frutose (EPS_{FRU}). A análise da composição monossacarídica, após hidrólise ácida, mostrou que todos os polímeros são constituídos exclusivamente por glucose e a cromatografia de filtração em gel indicou baixo grau de polidispersividade. Experimentos com o corante Congo Red evidenciaram a presença de tripla hélice nos três polímeros produzidos pelo fungo *B. rhodina* MAMB-05. Os três polissacarídeos comportaram-se como fluidos não-Newtoniano com características de soluções pseudoplásticas e tixotrópicas e com diminuição da viscosidade quando em presença de NaCl. As soluções aquosas de EPS_{GLU}, EPS_{SAC} e EPS_{FRU} apresentaram comportamento viscoelástico, com características de gel forte em 5 e 25°C, não sofrendo mudanças no comportamento, mesmo em presença de NaCl, a 25°C. As soluções polissacarídeos mantiveram as características de géis fortes, com propriedades termoestáveis e termorresistentes, entre 5 a 95°C de temperatura. Esses resultados permitiram concluir que os EPS produzidos pelo fungo *B. rhodina* MAMB-05 possuem propriedades químicas e físicas, passíveis de utilização nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e biomédica.

Palavras chaves: Exopolissacarídeos; *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05; Botryosphaerana; Análises reológicas.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are polymers produced by a great variety of microorganisms and can possess different physical and chemical properties, and structural features. Considering the growing interest in commercial applications of polysaccharides that show rheological compatible behavior within the application, as in the food, pharmaceutical, cosmetic and textile sectors, research have been developed in attempts to discover new promising biomolecules for such applications. The objective of the work presented was to determine the rheological characteristics of the exopolysaccharide botryosphaeran produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 on three different sole carbon sources: glucose (EPS_{GLU}), sucrose (EPS_{SUC}) and fructose (EPS_{FRU}). The analysis of monosaccharide composition, after acid hydrolysis, showed glucose as the only component and the gel permeation chromatography indicated that the EPSs have an excellent purity grade. All three biopolymers produced by *B. rhodina* MAMB-05 were found to exist in the triple helix conformational state. The three exopolysaccharides showed non-Newtonian behavior, with pseudoplastic and thixotropic characteristics, and showed a slight decrease in viscosity in presence of NaCl. The three biopolymer gels showed viscoelastic behavior, with characteristics of strong gelling at 5 °C and 25 °C, without suffering behavioral changes, even in the presence of NaCl at 25 °C. The polysaccharide solutions kept the strong gel characteristics possessing thermo-stable and thermo-resistant properties when evaluating the influence of temperature (5 – 95 °C) over the viscoelastic behavior of solutions. The results concluded that the EPS's produced by fungus *B. rhodina* MAMB-05 have physical and chemical properties amenable for use in the food, pharmaceutical, cosmetic and biomedical industries.

Key Words: Exopolysaccharides; *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05; Botryosphaeran; Rheological analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura dos heteropolissacarídeos (A e B) e homopolissacarídeos (C, D, E, F, G).....	23
Figura 2 -	(A) Ilustração da conformação em hélice simples da $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucanas, (B) Simulação tridimensional em tripla hélice da $\beta(1\rightarrow3)$ (1 $\rightarrow$ 6) glucana (escleroglucana).....	28
Figura 3 -	Botriosferana: $\beta(1\rightarrow3)$ (1 $\rightarrow$ 6) -D-glucana.....	31
Figura 4 -	Fluxo entre duas placas paralelas.....	33
Figura 5 -	Representação esquemática de líquido em repouso (superior) e após a aplicação de uma taxa de cisalhamento (inferior).....	34
Figura 6 -	Vários tipos de comportamento de fluxo.....	36
Figura 7 -	Classificação do comportamento reológico de fluidos	37
Figura 8 -	Comportamento viscoso e viscoelástico.....	38
Figura 9 -	Representação gráfica genérica de sistemas polissacarídeos submetidos a medidas reológicas dinâmicas. a) gel forte, b) solução concentrada ou gel fraco, e c) solução diluída.....	40
Figura 10 -	Produção do botriosferana em três fontes de carbono. A) Cultivo estoque do <i>Botryosphaeria rhodina</i> ; B) Pré-inóculo em meio (VGA), depois de 5 dias 28 ± 2 °C; C) Interrupção do cultivo para posterior centrifugação do material “EPS mais micélio” ; D) Micélio sendo reservado após a centrifugação do EPS; E) Sobrenadante após centrifugação, seguindo para precipitação em etanol; F) EPS precipitado após “overnight” em etanol; G) EPS solubilizado em água e resfriado; H) EPS liofilizado.....	46

Figura 11 -	A) Reômetro HAAKE RS75 Rheostress; B) Ilustração dos EPS solubilizados; C) Amostra sendo colocada na placa estacionária do reômetro; D) Exopolissacarídeo após varredura a 5°C.....	52
Figura 12 -	Ilustração do sensor cone-placa utilizado no reômetro.....	53
Figura 13 -	Cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL – 4B dos EPS produzidos em glucose, frutose e sacarose. Total de EPS aplicado: 2,0 mg; fluxo: 0,3 mL/min; eluente: H ₂ O; volume da fração: 2,6 mL para EPS _{GLU} e EPS _{SAC} e 2,9 mL para EPS _{FRU} ; volume da coluna: 30,0 mL.....	59
Figura 14 -	Análise dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida dos EPS _{GLU} , EPS _{SAC} , EPS _{FRU} e EPS _{XAN} por HPAEC/PAD. Padrões de açúcares neutros (Pd), com tempos de retenção em min: fucose (6.13); arabinose (9.76); rhaminose (10.48); galactose (12.83); glucose (14.08); manose (15.50). Condições da corrida: isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 5M, 16 horas, 100 °C. Quantidade de material: 50µg.....	62
Figura 15 -	Análise conformacional do EPS produzido em diferentes fontes de carbono (glucose “EPS _{GLU} ”, sacarose “EPS _{SAC} ”, frutose “EPS _{FRU} ” e o padrão de goma Xantana “EPS _{XAN} ”)......	64
Figura 16 -	Curva de fluxo, tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS _{GLU} , nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25°C.....	66
Figura 17 -	Curva de fluxo, tensão de cisalhamento (τ) versus a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS _{SAC} , nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25° C.....	66
Figura 18 -	Curva de fluxo, tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS _{FRU} , nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25° C.....	67
Figura 19 -	Viscosidade absoluta (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS _{GLU} , nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25° C.....	68
Figura 20 -	Viscosidade aparente (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS _{SAC} , nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25° C.....	69

Figura 21 -	Viscosidade aparente (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS _{FRU} , nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25° C.....	69
Figura 22 -	Soluções aquosas do EPS _{GLU} á temperatura 25°C. (a) 3g/L e (b) 6g/L.....	70
Figura 23 -	Viscosidade absoluta (η) em função da velocidade de cisalhamento dos (EPS _{GLU} , EPS _{SAC} e EPS _{FRU}), 6g/L em solução aquosa de NaCl (1g/L) a 25°C.....	73
Figura 24 -	Análise do comportamento viscoelástico do EPS _{GLU} em 6g/L; —■— G' módulo elástico; —●— G'' módulo viscoso; —▲— η^* viscosidade complexa. (A) em solução aquosa a 25°C; (B) em solução aquosa a 5°C; (C) em solução aquosa de NaCl (1g/L) a 25°C.....	75
Figura 25 -	Análise do comportamento viscoelástico do EPS _{SAC} em 6g/L; —■— G' módulo elástico; —●— G'' módulo viscoso; —▲— η^* viscosidade complexa. (A) em solução aquosa a 25°C; (B) em solução aquosa a 5°C; (C) em solução aquosa de NaCl (1g/L) a 25°C.....	76
Figura 26 -	Análise do comportamento viscoelástico do EPS _{FRU} em 6g/L; —■— G' módulo elástico; —●— G'' módulo viscoso; —▲— η^* viscosidade complexa. (A) em solução aquosa a 25°C; (B) em solução aquosa a 5°C; (C) em solução aquosa de NaCl (1g/L), a 25°C.....	77
Figura 27 -	Comportamento do módulo elástico (G') dos três exopolissacarídeos —■— EPS _{GLU} , —●— EPS _{SAC} e —▲— EPS _{FRU} estudados a 25°C (A) e 5°C (B).....	80
Figura 28 -	Rampa de temperatura. Curva ascendente (5 a 95°C) e descendente (95 a 5°C), com aumento de 1,5°C/min. Em solução aquosa (6g/L).....	81
Figura 29 -	Tensão de cisalhamento (τ) versus a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) dos três exopolissacarídeos produzidos pelo fungo <i>B. rhodina</i> , nas concentrações de 6g/L a 25°C.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fontes de origem dos “hidrocolóides ou gomas” com aplicações industriais.....	24
Tabela 2 -	Ensaio analítico para a formação do complexo CR/EPS.....	51
Tabela 3 -	Produção final dos EPS (liofilizados) e as quantificações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas dos polissacarídeos produzidos pelo <i>B. rhodina</i> , em três fontes de carbono.....	58
Tabela 4 -	Viscosidade absoluta das soluções aquosas e das soluções aquosa de NaCl dos EPS _{GLU} , EPS _{SAC} e EPS _{FRU} , 6g/L, nas taxas de cisalhamentos 1,02, 10,59 e 99,19(1/s), à temperatura de 25°C.....	71
Tabela 5 -	Valores obtidos de (G') nas varreduras de frequências dos EPS _{GLU} , EPS _{SAC} e EPS _{FRU} , na frequência da 1 Hz.....	79

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

EPS	- Exopolissacarídeos
EPS _{FRU}	- Exopolissacarídeos produzidos com frutose como fonte de carbono
EPS _{GLU}	- Exopolissacarídeos produzidos com glucose como fonte de carbono
EPS _{SAC}	- Exopolissacarídeos produzidos com sacarose como fonte de carbono
f	- Frequência
G*	- Módulo de cisalhamento dinâmico complexo
G'	- Módulo de cisalhamento dinâmico elástico
G''	- Módulo de cisalhamento dinâmico viscoso
Hz	- Hertz
M	- Molar
mg	- Miligrama
mL	- Mililitros
η	- Viscosidade absoluta
η^*	- Viscosidade Complexa
τ	- Tensão de Cisalhamento
$\dot{\gamma}$	- Taxa de Cisalhamento
kDa	- Kilodaltons
m/v	- Massa/volume
pH	- Potencial hidrogeniônico
rpm	- Rotações por minuto
TFA	- Ácido trifluoracético
v/v	- Volume/volume
α	- Alfa
β	- Beta
μL	- Microlitro
μm	- Micrômetro
σ_0	- Amplitude Máxima de Tensão
γ_0	- Amplitude Máxima de Deformação
δ	- Ângulo de Mudança de Fase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos gerais	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Polissacarídeos	20
3.2 Exopolissacarídeos.....	22
3.2.1 Exopolissacarídeos bacterianos	24
3.2.2 Exopolissacarídeos fúngicos	27
3.2.3 Botriosferana, exopolissacarídeo produzido pelo fungo <i>Botryosphaeria rhodina</i>	
MAMB-05.....	30
3. 3 Reologia	31
3.3.1 Reologia de fluidos.....	32
3.3.1.1 Líquidos Newtonianos	35
3.3.1.2 Líquidos não-Newtonianos	35
3.3.1.3 Comportamento viscoelástico	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Materiais.....	42
4.1.1 Microrganismo.....	42
4.1.2 Reagentes	42
4.1.3 Equipamentos	42
4.2 Métodos Gerais	43
4.2.1 Manutenção do Microrganismo	43
4.2.2 Produção do botriosferana	43

4.2.3 Cultivo estoque do <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05	44
4.2.4 Cultivo do <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05	44
4.2.4.1 Pré-inóculo	44
4.2.4.2 Inóculo	44
4.2.4.3 Preparo dos meios e cultivo	44
4.2.4.4 Interrupção do cultivo.....	45
4.2.4.5 Isolamento dos exopolissacarídeos	45
4.2.3 Análises quantitativas nos EPS _{GLU} , EPS _{SAC} , EPS _{FRU} e padrão xantana EPS _{XAN}	47
4.2.3.1 Determinação de açúcares totais - método do fenol - ácido sulfúrico.....	47
4.2.3.2 Determinação dos açúcares redutores - método de Somogyi – Nelson.....	47
4.2.3.3. Determinação de proteínas - método de Bradford	48
4.2.4. Cromatografia de filtração em gel em coluna Sepharose CL-4B.....	48
4.2.5 Hidrólise Ácida Total	49
4.2.6 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica (HPAEC)	49
4.2.4 Análise da estrutura dos EPS	50
4.2.5 Análises reológicas	51
4.2.5.1 Métodos reológicos	51
4.2.5.2 Preparo das soluções de β glucanas	52
4.2.5.3 Determinação das viscosidades absolutas	53
4.2.5.4 Curvas de fluxo	53
4.2.5.5 Análise oscilatória em sistema dinâmico - Varredura de tensão e Varredura de Frequência.....	54
4.2.5.6 Rampa de temperatura	54
4.2.5.7 Tixotropia.....	55

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Produção e quantificação dos exopolissacarídeos produzidos pelo <i>Botryosphaeria rhodina</i> em três diferentes fontes de carbono.	56
5.2 Verificação da homogeneidade dos exopolissacarídeos por cromatografia de filtração em gel	58
5.3 Hidrólise ácida total e análise por HPAEC/PAD dos exopolissacarídeos produzidos pelo <i>B. rhodina</i> nas diferentes fontes de carbono	60
5.4 Análise da conformação dos exopolissacarídeos produzidos pelo <i>B. rhodina</i>, em diferentes fontes de carbono	63
5.5 Análise Reológicas	65
5.5.1 Curvas de fluxo	65
5.5.2 Curvas de viscosidade	67
5.5.3 Análise em sistema dinâmico	74
5.5.4 Rampa de temperatura	80
5.5.5 Tixotropia	82
6. CONCLUSÃO.....	85
7. REFERÊNCIAS	86
ANEXO.....	97

1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares produzidos por uma variedade de bactérias e fungos e são secretados no meio de cultivo ou ligados à superfície das células. Essas moléculas possuem a característica de formar soluções viscosas, mesmo em baixas concentrações. Os EPS vêm substituindo progressivamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais, como plantas e animais. Devido às suas propriedades de geleificantes, espessantes, estabilizantes, agentes modificadores de textura, emulsificantes e formadores de filmes de revestimento ou embalagens, têm sido aplicados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, têxtil e biomédica.

O uso potencial de biopolímeros nos diferentes ramos industriais já é consenso na literatura existente e, neste contexto, novas fontes microbianas têm sido investigadas com o objetivo de se encontrar polissacarídeos com propriedades físicas e químicas que permitam as suas aplicações. Essas pesquisas concentram-se nos polissacarídeos extracelulares, pois são de fácil extração e purificação e apresentam, geralmente, um alto rendimento na produção.

Os biopolímeros microbianos podem diferir quanto à composição monossacarídica e, conseqüentemente, em suas propriedades físicas e químicas. Para o polissacarídeo ser comercializado é importante que possua algumas características reológicas interessantes, tais como: formar soluções viscosas em baixas concentrações, possuir alta solubilidade, manter a viscosidade e estabilidade em ampla faixa de pH, temperatura e em presença de sais.

Segundo alguns autores uma outra propriedade importante em biopolímeros caracterizados como glucanas com ligação do tipo β , é a estrutura em tripla hélice, fundamental tanto para a atividade biológica quanto para a manutenção da viscosidade das soluções polissacarídicas.

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 quando cultivado em glucose como fonte de carbono produz um exopolissacarídeo denominado botriosferana, cuja estrutura possui uma cadeia principal formada por unidades β -D-glucopiranosídicas 1,3 ligadas, com cerca de 20% de substituição em C-6, por unidades de glucose e gentiobiose.

O exopolissacarídeo botriosferana pode ser obtido, a partir do mesmo fungo, cultivado em outras fontes de carbono tais como frutose, manose, sacarose, melaço de cana de

açúcar, entre outras. A diferença básica entre o botriosferana produzido nas diversas fontes de carbono está no grau de ramificação.

Considerando-se a ausência de informações na literatura científica sobre estudos reológicos dos EPS produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, este trabalho foi concebido com o objetivo de iniciar esse estudo no botriosferana produzido em três diferentes fontes de carbono: glucose, frutose e sacarose, que já possuem sua estrutura química, anteriormente, determinada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente estudo tem por objetivo geral avaliar a conformação e algumas propriedades reológicas do botriosferana, exopolissacarídeo produzido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.

2.2 Objetivos específicos

- a) Produzir os exopolissacarídeos do *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em meio de cultivo quimicamente definido com três diferentes fontes de carbono: glucose, frutose e sacarose.
- b) Verificar a homogeneidade dos polímeros por cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B.
- c) Estudar a conformação dos exopolissacarídeos
- d) Analisar o comportamento reológico dos exopolissacarídeos produzidos nas três diferentes fontes de carbono.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polissacarídeos

Polissacarídeos são biopolímeros versáteis que podem ser encontrados na natureza sob as mais diversas formas, exercendo diferentes funções. Nos vegetais podem ser extraídos de raízes, tubérculos, caules e sementes, nos quais atuam como reserva de energia, como é o caso do amido e da inulina; outras vezes, podem ser encontrados na estrutura celular de tecidos vegetais, onde contribuem para a integridade estrutural e para a força mecânica, formando redes hidratadas tridimensionais, como é o caso das pectinas, em plantas terrestres, e das carragenanas, ágar e alginato, em plantas marinhas (TONELI; MURR; PARK, 2005, p. 189).

Os polissacarídeos são polímeros com massa molecular relativamente alta, com características específicas de identidade nas suas unidades monossacarídicas, nos tipos de ligação que as unem, no comprimento das suas cadeias e no grau de ramificação destas. Podem ser classificados como homopolímeros ou heteropolímeros (NELSON; COX, 2000, p. 247).

Segundo Gómes e colaboradores (2007) os polímeros de carboidrato possuem grande aplicabilidade na indústria de alimentos. O uso mais freqüente está associado à sua capacidade de espessar, estabilizar, emulsificar e geleificar soluções, sendo aplicados para melhorar e padronizar a qualidade dos alimentos processados, bem como o uso como filmes comestíveis (LOPES; ANDRADE; MANO, 1991; MAIA; PORTE; SOUZA, 2000; ARAÚJO; ALVES, 2003).

O termo “hidrocolóide ou goma” compreende todos os polissacarídeos hidrossolúveis, que podem ser obtidos de plantas, algas marinhas e fontes microbianas (Tabela 1), bem como gomas derivadas de exsudatos de plantas e biopolímeros produzidos por tratamento químico ou enzimático do amido ou celulose (DICKINSON, 2003).

O uso de polissacarídeos como espessante está associado à capacidade que possuem de aumentar a viscosidade de um líquido, resultando em características organolépticas e texturas desejáveis nos alimentos. São freqüentemente utilizados para eliminar efeitos indesejáveis tais como: liberação de água em alguns alimentos processados (CEREDA; VILPOUX; DEMIATE, 2003, p.357), substitutos de gordura e integrantes na formulação de produtos de baixa caloria *light* (MONTEIRO et al., 2006), uma vez que

possuem menos “calorias” quando comparados com a gordura e, em alguns casos, não são absorvidos pelo organismo humano, promovendo efeitos benéficos à saúde (SGARBIERI; PACHECO, 1999; ALVAREZ; SÁNCHEZ, 2006).

As β -glucanas são uma classe de polissacarídeos constituídos por unidades repetitivas (monômeros) de glucose, unidas por ligações do tipo β , presentes nos vegetais e microrganismos. Constituem-se como o principal tipo de expolissacarídeos produzidos por fungos (BARBOSA et al., 2004, p.30). Lazaridou e Biliaderis (2007) relatam que esses polímeros, quando provenientes de cereais, combinam propriedades de hidrocolóides com propriedades fisiológicas de fibras dietéticas. Piñero e colaboradores (2004) e Monteiro e colaboradores (2006) propõem o uso das β -glucanas de cereais, de baixo conteúdo calórico uma vez que não são absorvidas no intestino delgado, como substitutos de gorduras em alimentos.

Segundo Saad (2006) as β -glucanas de cereais possuem, também, a capacidade de retardar a absorção de glucose, modulando os níveis plasmáticos de insulina e da glucose. Ressalta ainda que o consumo desses polissacarídeos pode resultar em diminuição de lipídeos plasmáticos, diminuindo o risco de câncer de cólon, redução da fome e/ou aumento da saciedade e possível diminuição de pressão sanguínea.

A maioria das pesquisas na área de alimentos concentra-se na busca de novas moléculas com propriedades para melhorar a qualidade dos alimentos, causando ainda efeitos benéficos ao consumidor. As linhas de produtos funcionais ou nutracêuticos são bons exemplos do crescimento científico visto nos últimos anos. Os alimentos funcionais são definidos como compostos que oferecem vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podem também desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônico-degenerativas, quando ingerido como alimento. Já os produtos nutracêuticos são definidos como parte de um alimento, e proporcionam benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença, podendo estar na forma de suplementos dietéticos ou na constituição de outros alimentos. Exemplificando essas definições a aveia pode ser considerada um alimento funcional e as β -glucans, presentes em sua constituição, como alimento nutracêutico.

Do ponto de vista dos carboidratos as fibras apresentam grandes propriedades funcionais, sendo os oligossacarídeos e as β -glucanas bons exemplos de ingredientes nutracêuticos.

3.2 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio de cultivo na forma de material viscoso (CANILHA et al., 2006, p.32). Como resultado da produção do exopolissacarídeo, ocorre mudança na viscosidade do meio de cultivo, começando como um fluido Newtoniano de baixa viscosidade e finalizando como um fluido não-Newtoniano, de elevada viscosidade (MOREIRA et al., 2005; CHO et al., 2006).

Os exopolissacarídeos de origem microbiana apresentam algumas vantagens de obtenção em relação às outras gomas, tais como: não dependência das condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de menor espaço físico das instalações fabris. Além disso, as gomas de origem microbiana apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas, devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultivo (BARBOSA et al., 2004, p.30).

Os homopolissacarídeos (Figura 1, pg. 23) extracelulares tais como dextrana (NAESSENS et al., 2005), curdlana (CUNHA; GÓMEZ; AMORIM, 2003), pululana (LIN; ZHANG; THIBAUT, 2007) e levana (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005), são constituídos por somente um tipo de monossacarídeo e, geralmente, produzidos por uma só enzima ou por um sistema simples de enzimas, diferente dos heteropolissacarídeos (Figura 1, pg. 23), que contêm duas ou mais unidades monoméricas diferentes, e são sintetizados por sistemas enzimáticos mais complexos, exemplo das gomas gelana (BANIK; KANARI; UPADHYAY, 2000) e xantana (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Os exopolissacarídeos produzidos por uma grande variedade de microrganismos possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes possibilitando suas aplicações em indústrias de alimentos, como anteriormente citado, mas também na indústria farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil e de tintas (COLTRO, 2003, p.32) e vêm substituindo, progressivamente, os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais, como plantas e animais (LIN; CHANG, 2005, p.1419).

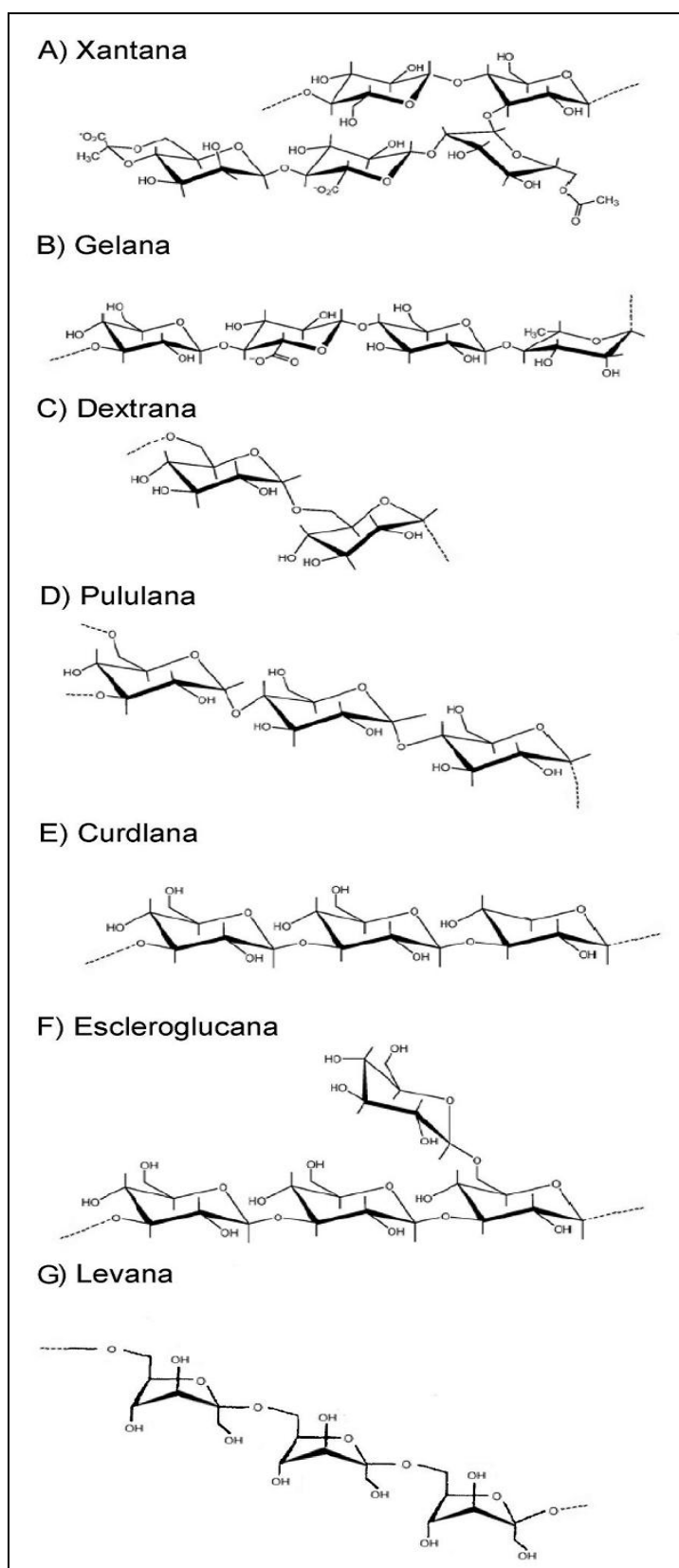


Figura 1 - Estrutura dos heteropolissacarídeos (A e B) e homopolissacarídeos (C, D, E, F, G).

Tabela 01 – Fontes de origem dos “hidrocolóides ou gomas” com aplicações industriais.

Tipo	Origem	Goma
Natural	Exsudatos vegetais (terrestres)	Goma arábica Goma karaia
	Sementes	Goma guar Goma Locusta ou alfarroba
	Extratos de plantas	Pectina Arabinogalactana
	Extratos de algas marinhas	Ágar Alginato Carragena Furcelana
	Grãos (milho, trigo, arroz,) Tubérculos (batata, mandioca)	Amidos
		Xantana Gelana Dextrana Curdiana Levana
Natural (Produtos microbianos)	Bacterianos	
	Fúngicos	Escleroglucana Pululana
Modificadas	Celulose	Carboximetilcelulose Metilcelulose Hidroxipropilcelulose Metiletilcelulose
	Amido	Amidos modificados com variações de estabilidades, viscosidade e de doçura.
	Extratos de algas marinhas	Alginato de propileno glicol

Fonte: (LOPES; ANDRADE; MANO, 1991, p.66; KIMURA et al., 2003, p.22; NAESSENS et al., 2005, p.845; GARCIA-OCHOA et al., 2000, CRUZ PRADELLA, 2006; YAMAMOTO et al., 1999; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005; CUNHA; GÓMEZ; AMORIM, 2003; CORRADI da SILVA et al., 2006)

3.2.1 Exopolissacarídeos bacterianos

A xantana (Figura 1-A, pg. 23) é um polímero formado por uma cadeia principal constituída de unidades β -D-glucopiranosídicas 4-O substituídas, assemelhando-se à celulose. Unidades pentassacarídicas repetitivas se dispõem ao longo da cadeia principal; elas se constituem por unidades de glucose alternadas com substituição em O-3 por uma ramificação trissacarídica: manose: ácido glucurônico: manose (GARCIA-OCHOA et al., 2000, p.550). A massa molecular da xantana pode variar de 2 a 12×10^6 Da, dependendo do

processo fermentativo e linhagem utilizada (ROTTAVA, 2005, p.14): ela é solúvel em água fria, produz soluções de elevada viscosidade em baixas concentrações e seu gel apresenta excelente estabilidade à variação de temperatura (0 a 100°C), mantendo as características de gel em ampla faixa de pH (1 a 13) (LÓPEZ et al., 2004, p.115).

A xantana é produzida pelo *Xanthomonas campestris* em meio contendo glucose ou sacarose como fonte de carbono e recebeu permissão de uso em alimentos pelo “Food and Drug Administration”- FDA, em 1969. Comercialmente, a goma xantana é um dos mais importantes polissacarídeos microbianos com uma produção mundial anual de cerca de 30.000 toneladas, movimentando um mercado de aproximadamente 408 milhões de dólares. As principais indústrias produtoras de goma xantana são Kelco (EUA), Rhône-Poulenc (França), Pfizer (EUA) e Mero-Rousselot-Santia (França) (CRUZ PRADELLA, 2006, p.38).

Um outro polissacarídeo aplicado na indústria é a dextrana constituído por unidades α -(1→6) D-glucopiranosídicas (Figura 1-C, pg. 23). A síntese de dextrana ocorre extracelularmente, sendo o substrato transformado em polissacarídeo sem ser interiorizado na célula. Isso é possível graças a uma enzima denominada dextrana-sacarase (HONORATO et al., 2005, p.02), que é excretada pelo microrganismo no meio de cultura, na presença de sacarose. A dextrana-sacarase atua na molécula de sacarose, liberando a frutose e transferindo a glucose a uma molécula receptora, no caso moléculas de dextrana em expansão (NAESSENS et al., 2005, p.845).

Vários microrganismos sintetizam dextrana a partir de sacarose, destacando-se a bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, cuja produção industrial é feita a partir de uma única linhagem NRRL B-512(F), que sintetiza um polissacarídeo com 95% de ligações α (1→6) e 5% de α (1→3) (SANTOS; RODRIGUES; TEIXEIRA, 2005, p.01).

A dextrana possui aplicação na indústria farmacêutica atuando como matriz para imobilização de drogas e enzimas, como modificador de viscosidade e material para suportes em cromatografia hidrofóbica (NAESSENS et al., 2005; GIL et al., 2008). É metabolizada naturalmente, não é tóxica e não provoca reações adversas no organismo (CRUZ PRADELLA, 2006, p.39). É utilizada na indústria de alimentos como estabilizante e agente de viscosidade (CANILHA et al., 2006, p.36).

Levana, um exopolissacarídeo constituído por unidades de frutose β (2→6) ligadas (Figura 1-G, pg. 23) (ARVIDSON; RINEHART; GADALA-MARIA, 2006. p.144), pode ser sintetizado por vários grupos de bactérias, entre elas a *Zymomonas mobilis*; é obtido pela transfrutossilacção em meio fermentativo à base de sacarose, extrato de levedura e sais

minerais. É utilizado nas indústrias de cosméticos, alimentos e farmacêutica (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005, p.72).

Segundo Yoo e colaboradores (2004) as levanas possuem propriedades biológicas com capacidade de melhorar e ou reparar alguns processos no organismo humano, despertando o interesse da área médica. Podem atuar como: agentes prolongadores da ação de fármacos, prebióticos que são definidos como substâncias que promovem o crescimento de bifidobactérias no intestino humano (KAUR; GUPTA, 2002), agente hipocolesterolêmico (YAMAMOTO et al., 1999), imunomodulador e anticarcinogênico (CALAZANS et al., 2000; YOON et al., 2004). Na indústria de alimentos a levana é usada como espessante, fixador de cores e sabores e em produtos dietéticos. Além disso, sua hidrólise produz frutose que tem poder adoçante superior à sacarose.

Gelana é um polissacarídeo complexo cuja estrutura molecular consiste de unidades tetrassacarídicas repetitivas: glucose, ácido glucurônico e raminose (na proporção de 2:1:1), dispostas como β (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucose, β (1 $\rightarrow$ 4)-D-glucuronato, β (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucose e α (1 $\rightarrow$ 4)-L-raminose (Figura 1-B, pg. 23). É produzido pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*, anteriormente denominada de *Pseudomonas elodea*, gram-negativa, aeróbia e de pigmentação amarela (BANIK; KANARI; UPADHYAY, 2000, p.408).

Segundo Yamamoto e Cunha (2007) o polissacarídeo gelana possui boa estabilidade em ampla faixa de pH, produzindo um gel termorreversível que vem substituindo o ágar (SUTHERLAND, 1998). Devido à estabilidade em pH ácido, a goma gelana vem sendo utilizada pela indústria de alimentos principalmente em produtos a base de frutas (CANILHA et al., 2006; FREITAS et al., 2006).

As propriedades físico-químicas encontradas na gelana proporcionam sua utilização pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e outras, pois pode ser usada como texturizante, estabilizante, espessante, emulsificante e agente geleificante (BANIK; KANARI; UPADHYAY, 2000; SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Curdiana, um polissacarídeo produzido pelas bactérias *Alcaligenes faecalis* variedade *myxogenes* e *Agrobacterium radiobacter* (CUNHA; GÓMEZ; AMORIM, 2003, p.380), faz parte do grupo de moléculas conhecidas como β (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanas (Figura 1-E, pg. 23).

Funami e colaboradores (1999) relataram que a curdlana, em suspensão aquosa, é capaz de formar gel por aquecimento e, de acordo com a temperatura de aquecimento, há formação de dois tipos de géis. O gel “low-set” se forma quando a suspensão

aquosa de curdlana é aquecida entre 50 °C a 60 °C e, então, resfriada a temperaturas inferiores a 40 °C; o gel é termorreversível, similar ao ágar e à gelatina. Quando a suspensão aquosa de curdlana é aquecida em temperaturas superiores a 80 °C, forma-se o gel “high-set”, que se caracteriza como um gel firme, resistente, não termorreversível e bastante estável a uma ampla faixa de temperatura de congelamento.

Segundo Cunha e colaboradores (2004) a curdlana é um hidrocolóide microbiano que apresenta propriedades físico-químicas interessantes do ponto de vista industrial, tendo potencial para ser utilizada como aditivo alimentar, em pequenas quantidades, contribuindo para a melhoria da estabilidade e da qualidade de inúmeros produtos alimentícios, podendo ser utilizada no desenvolvimento de novos produtos.

3.2.2 Exopolissacarídeos fúngicos

Existe uma variedade de polissacarídeos produzidos por fungos, porém poucos foram adequadamente explorados, e um número pequeno tem sido produzido em escala industrial. Segundo Barbosa e colaboradores (2004) a maioria dos exopolissacarídeos fúngicos são β -glucanas.

As β -glucanas de fungos são polissacarídeos com função estrutural. Podem ser encontradas na parede celular do micélio, no corpo de frutificação ou ser excretadas como exopolissacarídeos. São estruturas altamente ordenadas, formadas principalmente por unidades de glucose, diferenciando-se pelo tipo de ligação glicosídica e massa molecular, características estas que conferem ações biológicas e reológicas distintas a essa classe de biomoléculas (CALAZANS et al., 2000; CORRADI da SILVA et al., 2006; MORADALI et al., 2007).

Os polissacarídeos fúngicos têm despertado interesse na área médica, devido a algumas atividades evidenciadas, tais como: uso como matriz hidrofílica para a liberação controlada de drogas (MATRICARDI et al., 2006; PALLESCHI, et al., 2006), para o desenvolvimento de vacinas bacterianas, como um agente anti-HIV (CHEN; SEVIOUR, 2007), modulador do sistema imunológico (ZHANG et al., 2007), agente cicatrizante (COELHO et al., 2002) e no controle de tumores (ZHANG et al., 2005a; CHEN; SEVIOUR, 2007).

Acredita-se que a atividade anti-tumor apresentada pelas β (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanas, tais como escleroglucana (*Sclerotium glucanicum*), esquizofilana (*Schizophyllum commune*), cinereana (*Botrytis cinerea*) e pestalotana (*Pestalotia sp*), está relacionada à organização da estrutura em tripla hélice (Figura 2), mantida pelas ligações de hidrogênio (ZHANG et al., 2005b), bem como pela complexidade da ramificação lateral e da massa molecular (CORRADI da SILVA et al., 2005; PALLESCHI et al., 2005).

Dentre os EPS produzidos por fungos, os que apresentam destaque do ponto de vista comercial e industrial são a escleroglucana, produzido por fungos do gênero *Sclerotium* e a pululana, produzida pelo *Aureobasidium pullulans*.

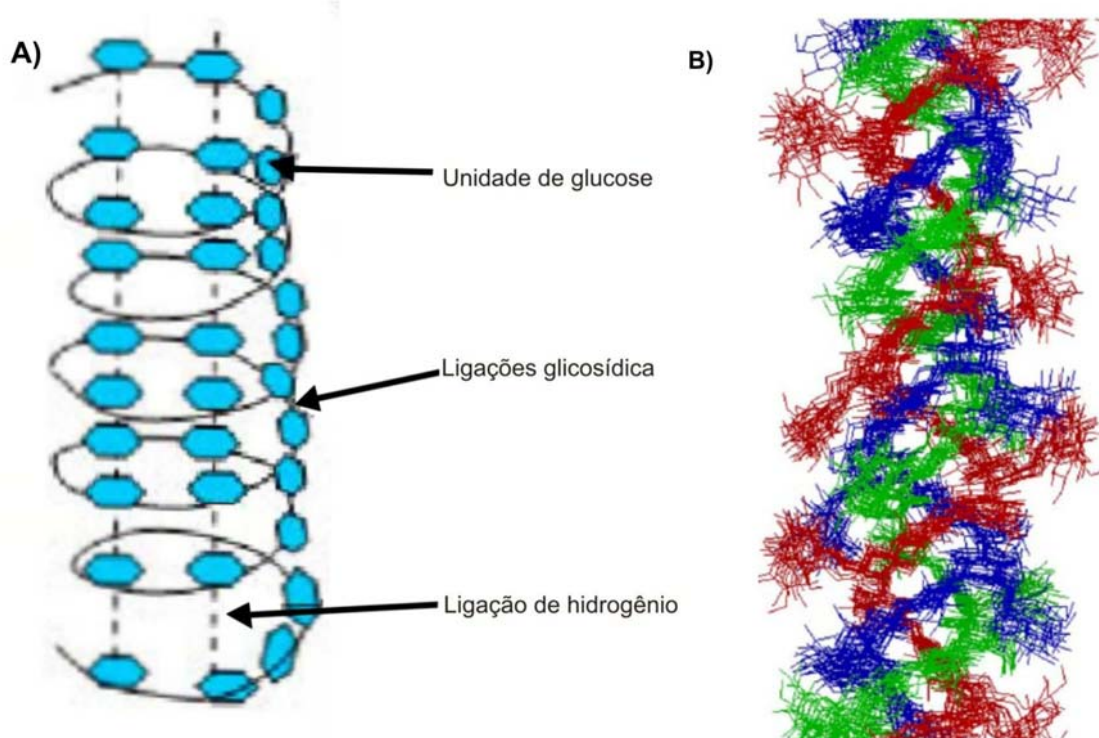


Figura 2 – (A) Ilustração da conformação em hélice simples da β (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanas (TAVARES, 2006), (B) Simulação tridimensional em tripla hélice da β (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) glucana (escleroglucana) (PALLESCHI et al., 2005).

Escleroglucana é um polímero composto por unidades glucopiranosídicas β (1 $\rightarrow$ 3)-substituídas com ramificações de glucose em C-6 (Figura 1-F, pg. 23), as quais podem estar ligadas regular ou randomicamente, com frequências diferentes. Variações no grau de ramificação afetam a solubilidade da molécula. Possuem diversas aplicações, uma vez que a viscosidade do EPS em solução se mantém em uma ampla faixa de temperatura e de pH (FARIÑA et al., 2001, p.45; COLINET et al., 2007, p. 66).

Este polímero apresenta atividade antitumoral, antimicrobiana, antivirótica e moduladora do sistema imune (ZHANG et al., 2007, p.5). Estudos mais recentes propõem a aplicação do escleroglucana como carreadores de drogas (FRANÇOIS; ROJAS; DARAIO, 2005; MATRICARDI et al., 2006; COVIELLO et al., 2007).

Viñarta e colaboradores (2006) aplicaram o escleroglucana, produzido pelo fungo *Sclerotium rolfsii*, para minimizar a sinérese (separação da fase aquosa) em soluções de amido de milho. Após 20 dias de refrigeração, os autores observaram 91% de redução da sinérese, ao mesmo tempo em que foram mantidas as características de gel, dureza e coloração das misturas, indicando futuro uso do EPS para melhorar a qualidade dos alimentos, passível de utilização pela indústria de alimentos.

Pululana é um exopolissacarídeo linear de glucose produzido pelo *Aureobasidium pullulans*. É constituído por unidades de maltotriose, α (1 $\rightarrow$ 4), alternadas por resíduos glucopiranosídicos α (1 $\rightarrow$ 6) ligados (Figura 1-D, pg. 23), cuja relação depende da linhagem fúngica estudada (LIN; ZHANG; THIBAUT, 2007, p.820). Dependendo da proporção dessas ligações na cadeia do polímero, as propriedades físicas da molécula variam, tais como: flexibilidade da estrutura, aumento da solubilidade em água e capacidade de formação de filme e fibra.

O pululana pode ser usado como aditivo em alimentos de baixa caloria. Tem a capacidade de formar filmes solúveis em água, com baixa permeabilidade ao oxigênio, atuando como revestimento de alimentos, apresentando capacidade de reter o sabor e aparência. Também é utilizado como excelente adesivo, espessante e pode ser usado na preparação de algumas fibras, sendo comestível e biodegradável (LAZARIDOU; BILIADERIS; KONTOGIORGOS, 2003, p.152). Para o crescimento do *Bifidobacterium* spp, um microrganismo benéfico da flora intestinal humana (SAAD, 2006), sugere-se a incorporação do pululana como prebiótico, que é uma substância capaz de promover o crescimento de bactérias desejáveis no cólon intestinal (SHIN et al., 2004).

Já é consenso entre os pesquisadores que os biopolímeros de origem fúngica sejam alvo de investigação científica devido às suas características químicas e reológicas que poderão possibilitar suas aplicações nas indústrias de alimentos, petrolífera, farmacêutica, cosmética e médica, entre outras.

3.2.3 Botriosferana, exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.

Fungos do gênero *Botryosphaeria* ssp. são ascomicetos que podem ser encontrados em diferentes ambientes, causando doenças em várias espécies de plantas, como eucalipto (SLIPPERS et al., 2004; BARBER et al., 2005) e, em algumas espécies de árvores frutíferas como cacaueiro, coqueiro, mamoeiro, bananeira, abacateiro (VIANA et al., 2003), macieiras (LUNARDI et al., 2002; VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2005) e videiras (GARRIDO; SONEGO; GOMES, 2004; ÚRBEZ-TORRES, 2006).

O *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 tem sido investigado por um dos grupos de Bioquímica Aplicada do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL, desde 1996. Este microrganismo foi descrito como produtor de lacases por Dekker e Barbosa (1996). Esses autores (2001) relataram que o microrganismo também secretava no meio de cultivo um exopolissacarídeo (EPS) do tipo β -glucana. Posteriormente foi caracterizado como uma β (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana (Figura 3), com cerca de 22% de ramificações no carbono 6 (BARBOSA et al., 2003) e denominado de botriosferana (Figura 3).

Em 2004, Steluti e colaboradores analisaram a influência de diferentes fontes de carbono (glucose, frutose, galactose, manose, manitol, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melaço de cana de açúcar) sobre a produção de botriosferana pelo *B. rhodina*, e concluíram que a sacarose comercial favorecia a formação do exopolissacarídeo em comparação a outras fontes de carbono estudadas.

Corradi da Silva e colaboradores (2005) caracterizaram os exopolissacarídeos quando o microrganismo foi cultivado, separadamente, em sacarose e frutose como fonte de carbono. Verificaram que o grau de ramificação era menor no EPS produzido em sacarose (21%) do que em frutose (31%); esta característica química conferia diferentes viscosidades às suas soluções.

Posteriormente, Miranda (2006) demonstrou que o botriosferana não é mutagênico, apresentando atividade hipoglicemiante e hipocolesterolêmica.

O conhecimento das propriedades reológicas bem como do peso molecular do botriosferana, produzido em diferentes fontes de carbono, são imprescindíveis para o emprego do polímero pelos diferentes setores da indústria.

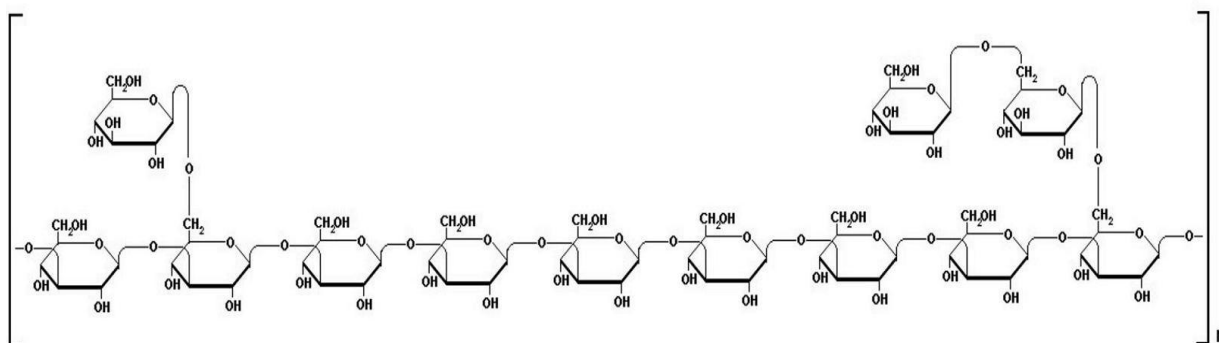


Figura 3 - Botriosferana: β -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana

3. 3 Reologia

Segundo Schramm (2006), a reologia descreve a deformação de um corpo sob a influência de tensões. Corpos, neste contexto, podem ser sólidos, líquidos ou gases. Sólidos ideais deformam-se elasticamente e a energia requerida para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida. Fluidos ideais, como os líquidos e gases deformam-se irreversivelmente, eles escoam e, neste caso, a energia requerida para a deformação é dissipada dentro do fluido na forma de calor e não pode ser recuperada simplesmente pela remoção das tensões.

Nas áreas da ciência dos alimentos a reologia possui grande importância. Segundo Haminiuk (2007) muitas das propriedades texturais que os humanos percebem quando consomem alimentos são basicamente reológicas, isto é, cremosidade, suculência, maciez, suavidade e dureza. Segundo Campos e colaboradores (1989), os dados reológicos em alimentos são essenciais para:

- a) Cálculos em engenharia de processos, envolvendo grande variedade de equipamentos, tais como bombas, tubulações, extrusores, misturadores, trocadores de calor, dentre outros;
- b) Determinação da funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos;
- c) Controle intermediário ou final da qualidade de produtos;
- d) Testes de tempo de prateleira;
- e) Avaliação da textura de alimentos e correlação com testes sensoriais.

A indústria de alimentos vem inovando com inúmeros produtos para atender as necessidades do consumidor. Uma dessas inovações foi o desenvolvimento de uma linha

de produtos *light* e *diet*. Alimentos pertencentes a esta classe possuem menor quantidade de calorias (*light*), ou ausência de algumas substâncias, ex: lipídeos, açúcares e sódio (*diet*). Com isso cresceu a utilização dos polissacarídeos microbianos, a fim de se tentar manter as características reológicas como viscosidade, fluidez, textura e cremosidade encontradas nos produtos originais, geralmente mantidas pelas gorduras (BARONI; FREITAS, 1999, p.22). O alto índice de obesidade e os possíveis distúrbios metabólicos, decorrentes do aumento de peso, fizeram com que a indústria disponibilizasse esses novos produtos.

A reologia considera dois materiais como ideais: o sólido elástico e o líquido viscoso. No sólido elástico a propriedade de maior interesse é a elasticidade, ou seja, um material com forma definida, quando deformado por uma força externa, sob determinadas condições, retornará à sua forma e dimensões originais, após a remoção dessa força. Já, no líquido viscoso a propriedade de maior interesse é a viscosidade, que tem como característica não possuir forma definida, escoando irreversivelmente com a aplicação de uma força externa (BRETAS; D'ÁVILA, 2005, p.69).

3.3.1 Reologia de fluidos

Isaac Newton foi o primeiro cientista a expressar a lei básica da viscosimetria, descrevendo o comportamento de fluxo de um líquido ideal, equação [1], onde τ é a tensão de cisalhamento, η é a viscosidade dinâmica ou aparente e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento ou deformação.

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad [1]$$

A deformação dos fluidos pode ser estudada como a realização de uma força contínua a uma taxa constante. Essa condição pode ser idealizada com a utilização de duas placas paralelas com o fluido colocado no espaço entre elas, como mostra a figura 4. A placa inferior é fixa e a superior se move a uma velocidade constante.

Tensão de cisalhamento (τ) relaciona a força F aplicada sobre a área A , sendo que a interface entre a camada superior e inferior do líquido, leva a um fluxo na camada líquida. A velocidade de fluxo que pode ser mantida por uma dada força é controlada pela resistência interna do líquido, ou seja, pela sua viscosidade (NAVARRO, 1997, p.74).

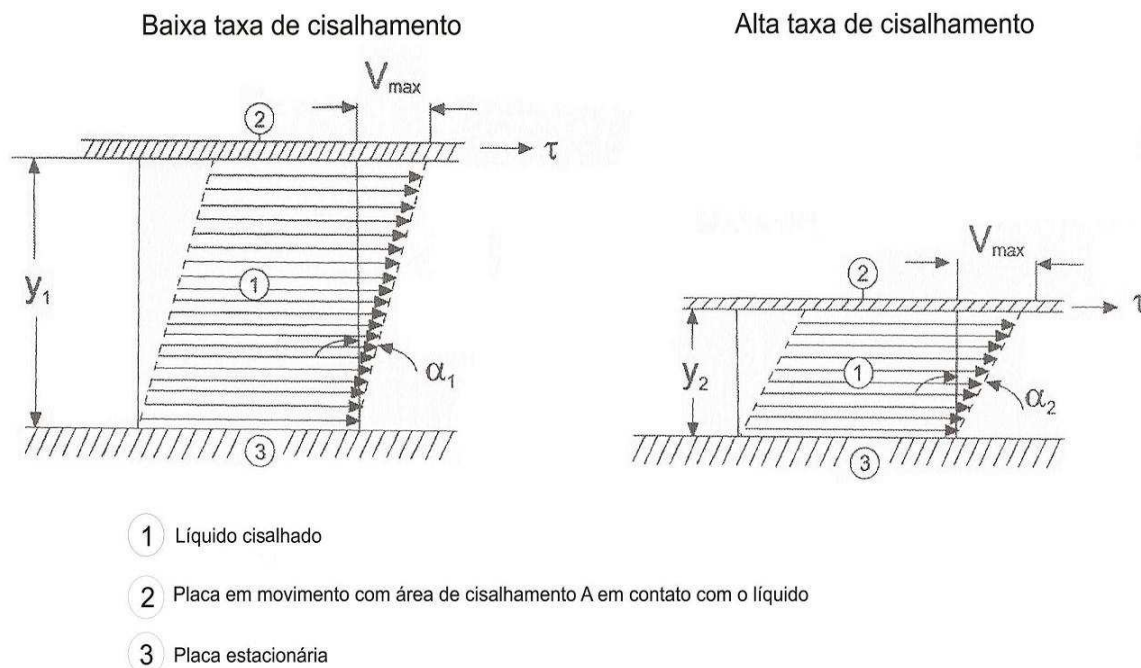


Figura 4 – Fluxo entre duas placas paralelas (SCHRAMM, 2006, p.29)

A tensão de cisalhamento faz com que o líquido flua num determinado padrão. A velocidade máxima é observada nas camadas superiores do líquido (Figura 4). A velocidade diminui das camadas superiores para as inferiores, apresentando uma velocidade mínima na camada mais inferior que está em contato com a superfície estacionária. Esse gradiente de velocidade é definido como taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). A $\dot{\gamma}$ é um fator decisivo que influencia na viscosidade de muitos líquidos. O aumento da taxa de cisalhamento pode diminuir ou aumentar a viscosidade (NAVARRO, 1997, p.78).

A tensão de cisalhamento em sólidos causa deformação, mas em líquidos ela causa uma taxa de deformação (quadrados superior e inferior da Figura 5). Isso significa, simplesmente, que os sólidos são elasticamente deformados, enquanto os líquidos fluem.

Com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 5), partículas rígidas se orientam em direção ao fluxo. Nas moléculas poliméricas, os entrelaçamentos entre elas podem ser desfeitos e as moléculas se orientam em direção ao fluxo. Partículas esféricas podem ser deformadas para uma forma mais alongada e com o cisalhamento, os agregados podem ser quebrados (BRETAS; D'ÁVILA, 2005, p.36).

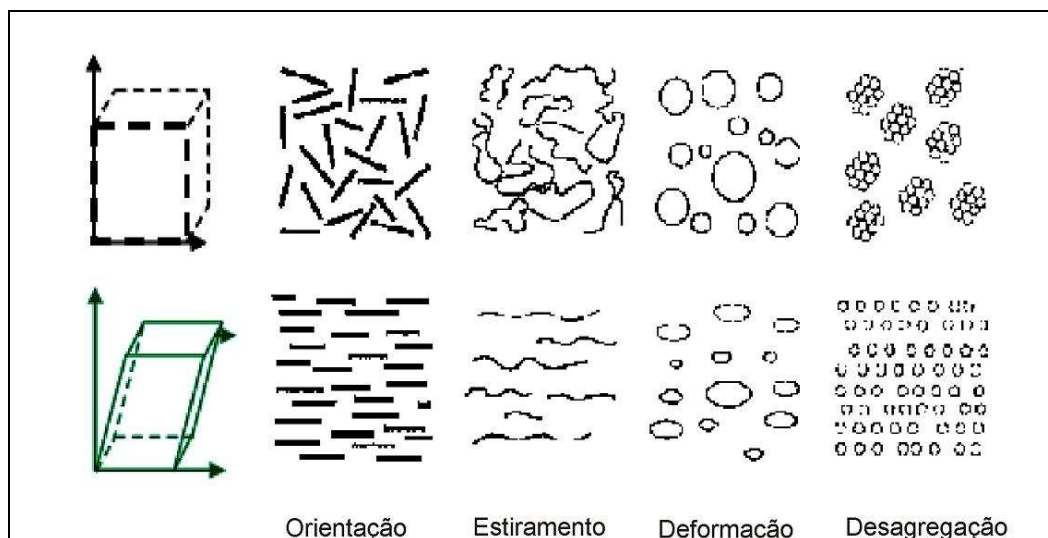


Figura 5 - Representação esquemática de líquido em repouso (superior) e após a aplicação de uma taxa de cisalhamento (inferior) (SCHRAMM, 2006, p.30).

A viscosidade é a propriedade reológica definida como a medida da fricção interna de um fluido, ou seja, sua resistência a fluir. Ela se torna aparente quando uma camada de fluido move-se em relação à outra camada. Assim, à medida que aumenta a viscosidade do fluido, aumentam as forças de atrito e é necessário mais energia para que haja escoamento. Com isso, fluidos altamente viscosos requerem maior força para se mover do que materiais menos viscosos (BRETAS; D'ÁVILA, 2005, p.55).

A viscosidade pode ser medida pela fórmula matemática apresentada na equação [2], onde η é a viscosidade dinâmica ou aparente, τ é a tensão de cisalhamento e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento ou deformação.

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad [2]$$

Entre os parâmetros que interferem na viscosidade dos polímeros, podemos citar o tipo de estrutura molecular, a temperatura e a concentração da solução polimérica analisada. A temperatura pode ocasionar uma diminuição da viscosidade, e soluções poliméricas concentradas tendem a ter valores maiores de η (PINTO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2002; SILVA; GUIMARÃES; GASPARETTO, 2005; TORALLES; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2006).

3.3.1.1 Líquidos Newtonianos

Newton assumiu que o gráfico equivalente à equação [1] para um líquido ideal seria uma linha reta, com início na origem da curva de fluxo ($\tau \times \dot{\gamma}$), e que esta reta subiria com uma inclinação de ângulo α (Figura 6). Qualquer ponto desta reta define pares de valores para τ e $\dot{\gamma}$. Dividindo um pelo outro se obtém o valor de η (equação [2]).

Como a curva de fluxo para um líquido ideal é uma reta, a razão de todos os pares de valores de τ e $\dot{\gamma}$ pertencentes a essa reta é constante (Figura 6). Isso significa que a viscosidade (η) não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento. Todos os líquidos para os quais essa afirmativa é verdadeira são chamados de líquidos Newtonianos, é o caso de líquidos puros, soluções verdadeiras diluídas e poucos sistemas coloidais. Ex: água, óleo mineral, melão, etc.

3.3.1.2 Líquidos não-Newtonianos

Todos os outros líquidos que não exibem esse comportamento de fluxo “ideal” são chamados de não-Newtonianos (Figura 6). Os líquidos não-Newtonianos são, em número, bem maiores que os Newtonianos.

Fluidos não-Newtonianos são definidos como aqueles onde a relação $\tau/\dot{\gamma}$ não é uma constante, ou seja, quando a taxa de cisalhamento varia, a tensão de cisalhamento não varia na mesma proporção (ou necessariamente na mesma direção) (MANO; MENDES, 1999). Assim, a viscosidade destes fluidos mudará conforme a variação da taxa de cisalhamento (Figura 6). Os fluidos não-Newtonianos são classificados como viscoelásticos ou inelásticos.

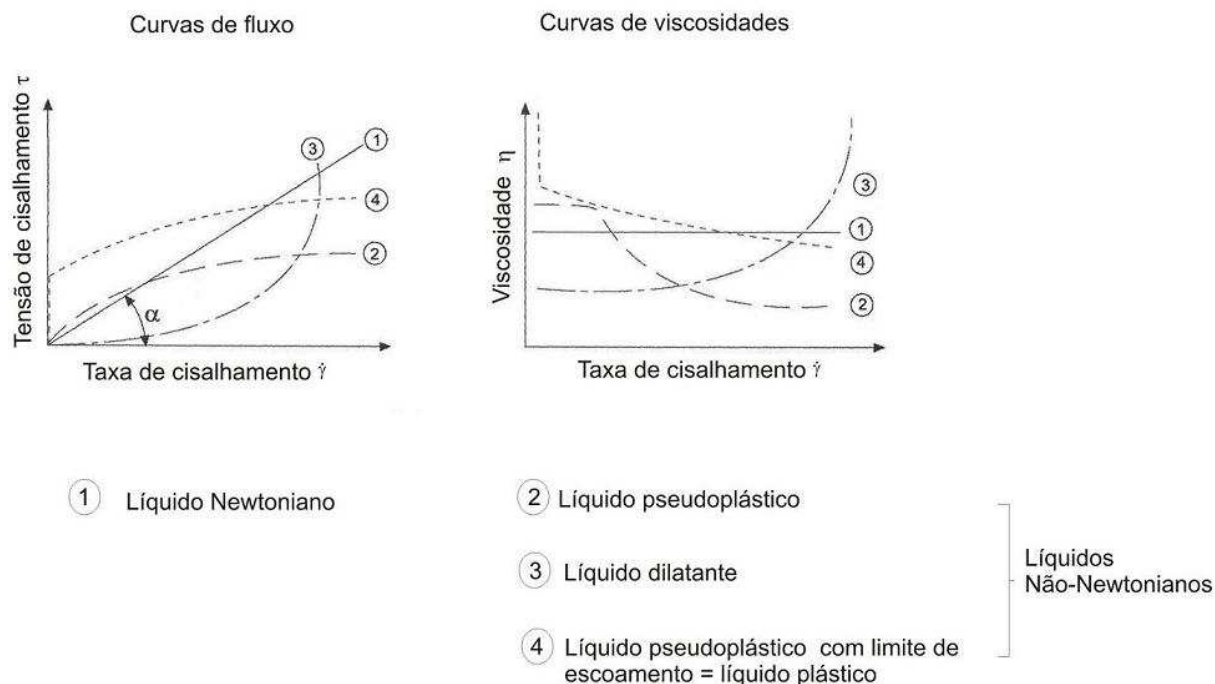


Figura 6 – Vários tipos de comportamento de fluxo (SCHRAMM, 2006).

Os fluidos não-newtonianos viscoelásticos apresentam, simultaneamente, propriedades de fluidos (viscosas) e de sólidos (elásticas) (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989). Já os fluidos não-Newtonianos inelásticos são classificados em independente de tempo e dependente de tempo, conforme figura 7. Os fluidos independentes do tempo, sob condições de temperatura e composição constantes, apresentam viscosidade aparente dependente somente da taxa de deformação ou da tensão de cisalhamento. Nos fluidos com comportamento dependente do tempo a viscosidade aparente também depende da duração dessa taxa de deformação.

Dentre os fluidos não-Newtonianos independentes do tempo, temos os pseudoplásticos, os dilatantes e os plásticos. Para os pseudoplásticos, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (SHAW, 1975), temos como exemplos as tintas, emulsões e dispersões de muitos tipos. Nos dilatantes a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento, exemplos caramelos e amidos de milho em água. Os fluidos plásticos comportam-se como sólidos sob condições estáticas, apresentando forças internas que o impedem de fluir até certa tensão de cisalhamento, quando então, começam a fluir. Exemplos desse tipo de fluidos incluem chocolate, catchup e maionese (FARIA-TISCHER, 2006, p.43).

Os fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo são aqueles em que ocorrem mudanças de viscosidade com o tempo, com a taxa de cisalhamento e com a

temperatura. Podem ser divididos em tixotrópicos e reopéticos. Nos fluidos tixotrópicos, a viscosidade diminui com o tempo para uma taxa de cisalhamento constante (COSTA, 2006, p.10) já para os reopéticos ocorre o contrário, ou seja, a viscosidade do fluido aumenta com o tempo para uma taxa de cisalhamento constante.

Os polissacarídeos microbianos apresentam comportamento pseudoplástico e viscoelástico característicos (COVIELO et al., 2007; TONELI; MURR; PARK, 2005; SUTHERLAND, 2001). Algumas características dos EPS são esperadas para sua aplicação na indústria, tais como: formar soluções viscosas em baixas concentrações, possuir alta solubilidade, apresentar viscosidade e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura e na presença de sais.

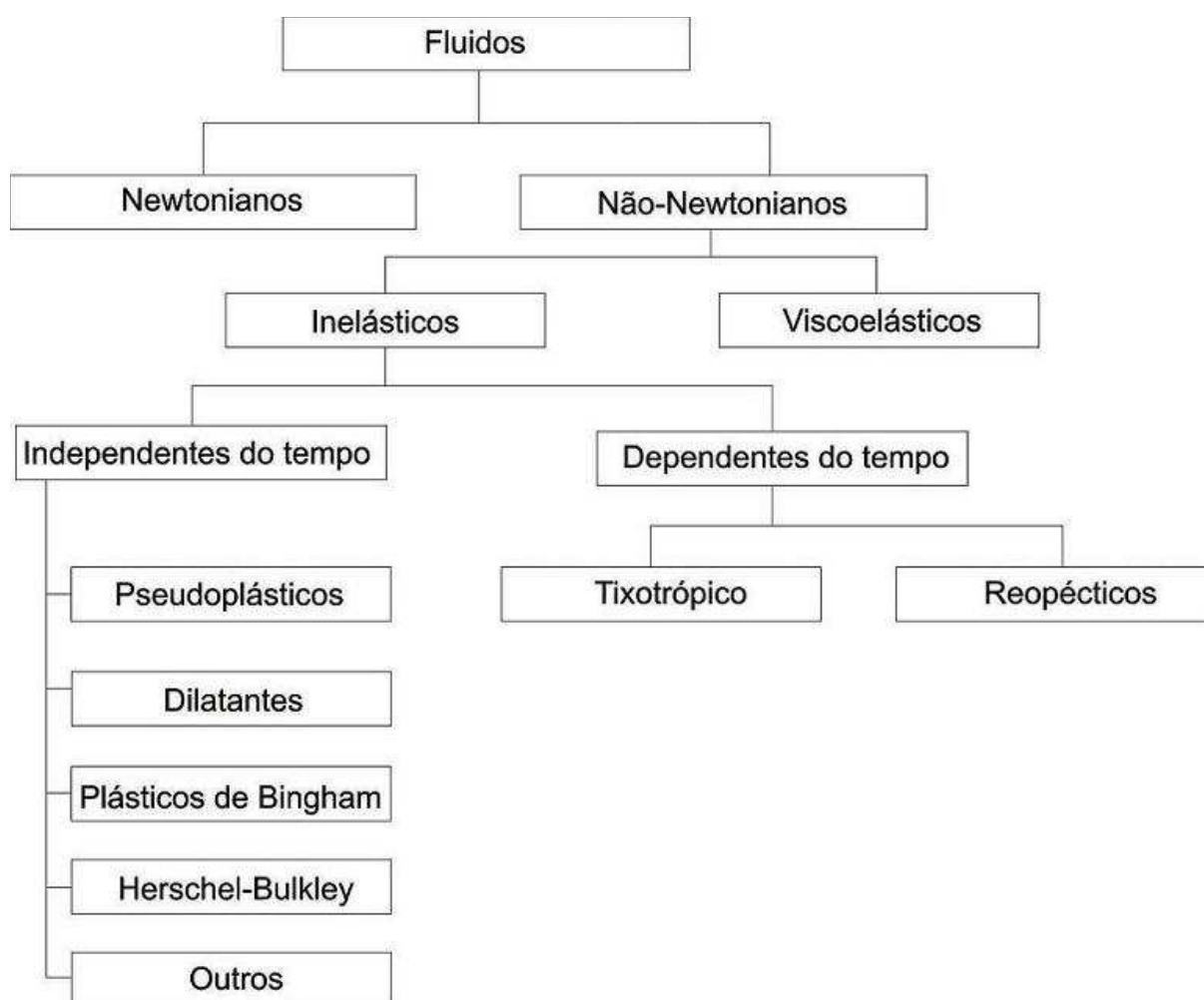


Figura 7 - Classificação do comportamento reológico de fluidos (TONELI; MURR; PARK, 2005, p.184).

3.3.1.3 Comportamento viscoelástico

As curvas de fluxo em regime estacionário são utilizadas para caracterizar o comportamento reológico de fluidos. A viscosidade é a propriedade de todos os fluidos, independentemente se eles exibem ou não comportamento elástico; no entanto, muitos fenômenos não podem ser descritos simplesmente em função da viscosidade e o seu comportamento elástico deve ser levado em consideração. A figura 8 apresenta o comportamento dos fluidos viscosos e fluidos viscoelásticos (viscoso e elástico) quando submetidos ao cisalhamento. Durante a agitação ou mistura, os fluidos viscoelásticos podem subir no rotor impulsor num fenômeno conhecido como efeito Weissenberg (BRETAS; D'ÁVILA, 2005, p.70).

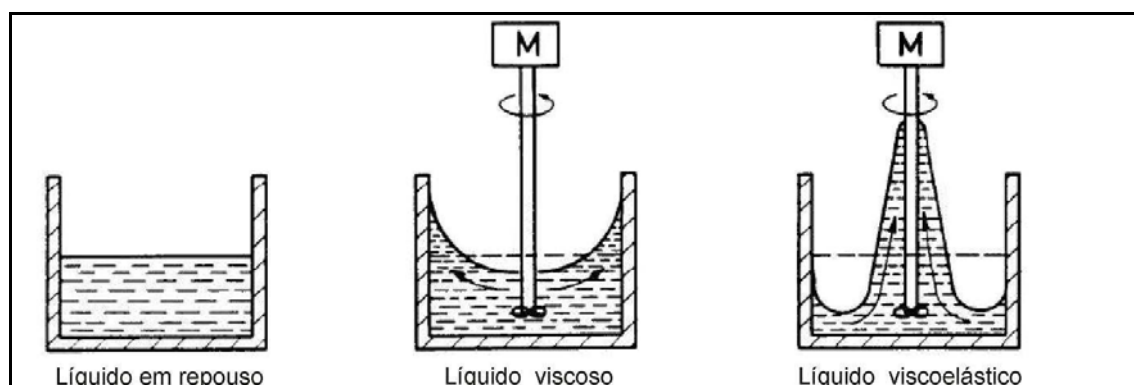


Figura 8 – Comportamento viscoso e viscoelástico (SCHRAMM, 2006, p.41).

O comportamento viscoelástico de uma solução polimérica pode ser conhecido a partir de estudos reológicos com análises dinâmicas ou oscilatórias e o grau de caráter sólido e líquido pode ser quantificado. O módulo de cisalhamento elástico (G'), diz respeito ao caráter sólido do material, enquanto o módulo de cisalhamento viscoso (G'') refere-se ao caráter líquido.

A energia usada na deformação de um sólido elástico é recuperada quando a amostra retorna ao seu estado original, enquanto que para um líquido ideal não há tal recuperação, e a energia é perdida. Assim, os módulos G' e G'' são também denominados módulos de estocagem e de perda, respectivamente (SCHRAMM, 2006, p.143). Para um material perfeitamente elástico toda a energia é armazenada; a tensão e a deformação encontram-se em fase e G'' é igual a zero. Para um líquido que não possui nenhuma propriedade elástica toda a energia é dissipada como calor, G' é igual a zero, e a tensão e a deformação estão fora de fase (IAGHER, 2000; DOUBLIER et al., 1993; SHAW, 1975).

Os módulos de cisalhamento elástico (G') e viscoso (G'') são dados pelas seguintes equações:

$$G' = (\tau_0 / \gamma_0) \cdot \cos \delta \quad [3]$$

$$G'' = (\tau_0 / \gamma_0) \cdot \sin \delta \quad [4]$$

$$G'' / G' = \tan \delta \quad [5]$$

onde:

G' = módulo de cisalhamento dinâmico elástico

G'' = módulo de cisalhamento dinâmico viscoso

τ_0 = amplitude de tensão

γ_0 = amplitude de deformação

δ = ângulo de fase

A resposta de uma amostra à tensão de deformação oscilatória pode ser caracterizada pelo módulo de cisalhamento dinâmico complexo G^* , que é dado pela seguinte equação:

$$G^* = (G'^2 + G''^2)^{1/2} \quad [6]$$

onde:

G^* = módulo de cisalhamento dinâmico complexo

G' = módulo de cisalhamento dinâmico elástico

G'' = módulo de cisalhamento dinâmico viscoso

O módulo dinâmico complexo G^* pode definir uma viscosidade complexa (η^*), que descreve a resistência total para uma medida dinâmica, e é expressa pela equação:

$$\eta^* = G^* / f \quad [7]$$

onde:

η^* = viscosidade dinâmica complexa

G^* = módulo de cisalhamento dinâmico complexo

f = frequência

A análise dinâmica de um material, através dos módulos de cisalhamento dinâmico G' e G'' e da viscosidade dinâmica complexa, permite caracterizá-lo como sendo mais viscoso ou mais elástico, conforme mostra figura 9 (MORRIS, 1995, p.518).

Quando a amostra polissacarídica apresenta o módulo de cisalhamento elástico (G') muito maior do que o módulo de cisalhamento viscoso (G'') (Figura 9-a), ambos independentes da frequência na região de viscoelasticidade, tem-se um material de caráter predominantemente sólido (ZHANG et al., 2008, p.3), tratando-se, portanto, de um gel forte.

Para as soluções poliméricas concentradas ou géis fracos o espectro revela, principalmente em baixas frequências, valores significativamente maiores de G'' , em relação a G' (Figura 9-b). Em frequências mais altas, entretanto, o comportamento aproxima-se daquele gel mostrado na figura 9-a, onde a resposta elástica (G') predomina sobre o fluxo viscoso (G'') e a η^* declina (TORRES; BEPPU; SANTANA, 2006, p.104).

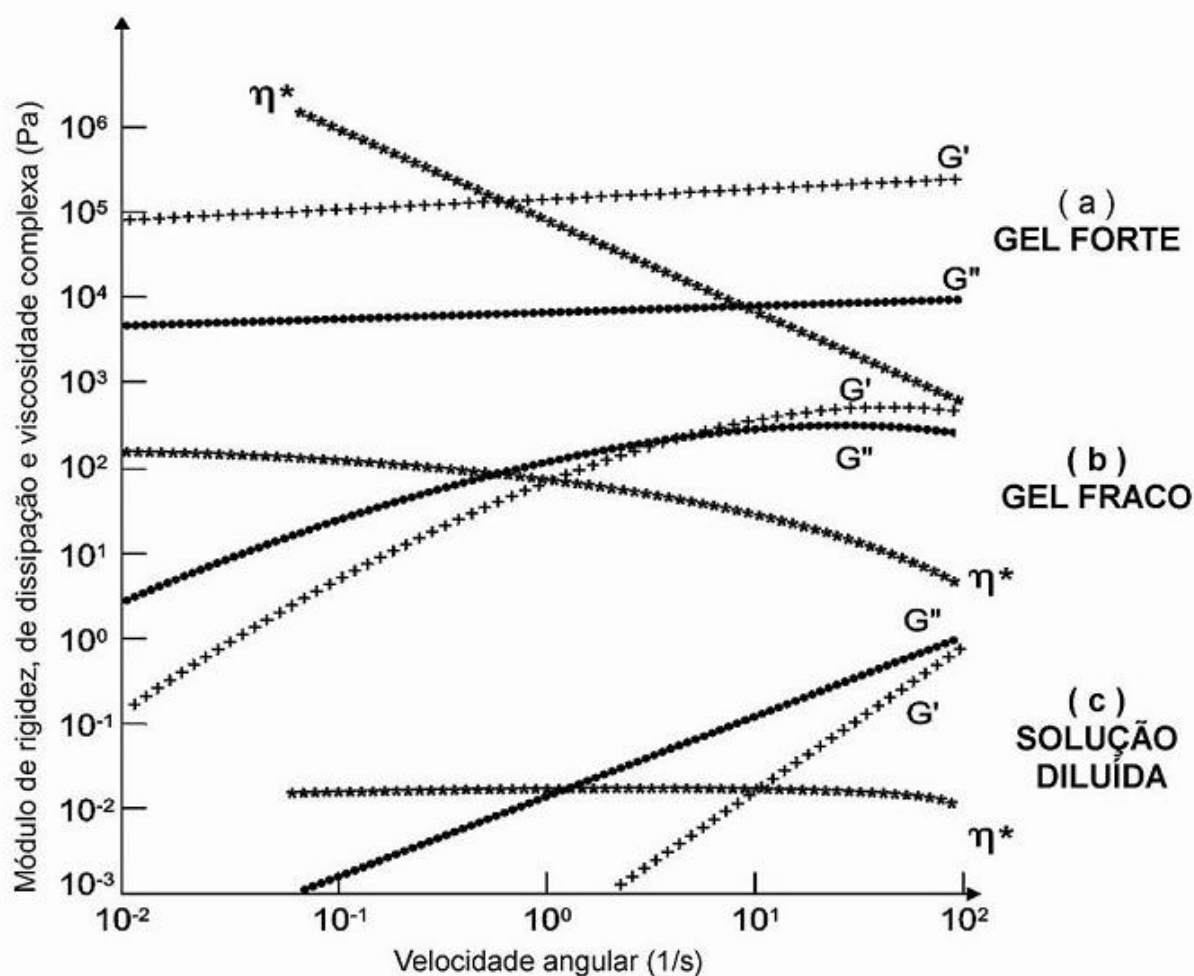


Figura 9 - Representação gráfica genérica de sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas. a) gel forte, b) solução concentrada ou gel fraco, e c) solução diluída (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005, p.150).

Em amostras com comportamento típico de soluções diluídas (Figura 9-a), a viscosidade dinâmica (η^*) mostra pequena variação com a frequência (demonstrando um comportamento essencialmente Newtoniano através da faixa de frequência alcançada) e o módulo de perda G'' é substancialmente maior do que o módulo de estocagem G' . Em baixas frequências G'' é maior que G' , enquanto que em frequências mais altas G' aproxima-se de G'' (STEFFE, 1996).

As variações de G' , G'' e η^* dão importantes informações para a caracterização da escala de tempo das interações moleculares em sistemas poliméricos, e estas medidas reológicas podem ser aplicadas para ambos os sistemas sólidos ou líquidos, monitorando processos tais como a formação de géis físicos constituídos por polissacarídeos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismo

Foi utilizado o fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* isolado de câncer de eucalipto por Barbosa, Dekker e Hardy (1996).

4.1.2 Reagentes

Os principais reagentes químicos utilizados para o preparo dos meios de cultivo, das soluções e os experimentos foram de grau analítico, obtidos da Merck, Fluka ou Sigma.

4.1.3 Equipamentos

Balanças Analíticas Mettler Toledo AB204, Micronal e em balanças semi-analítica Gehaka BG-440; Gehaka BG-2000.

Autoclave vertical Fabbre, modelo 103.

Câmara de fluxo laminar Veco, modelo VLFS-09.

Estufa incubadora Nova Ética 411D e incubadora orbital Cientec CT-712.

Centrífuga refrigerada Boeco U-32R

Evaporador Rotativo Buchi, modelo R-114, e banho-maria Buchi, modelo B-480.

Centrífuga Damon, modelo HT e microcentrífuga Beckman.

Espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1601.

Bloco de aquecimento Digi Block, Laboratory Devices INC.

Cromatógrafo Líquido de Troca Iônica (HPAEC) com detector Eletroquímico Modelo ED 40, Bomba Gradiente Modelo GP 40 e Integrador modelo 4600; da Dionex.

Gel de sepharose CL-4B, com auxílio de bomba peristáltica Pump P-1, Amersham Pharmacia Biotech.

Coletor Frac-100, Amersham Pharmacia Biotech.

Liofilizador modelo E.C, da Edwards.

Agitador da Fisatom.

Destilador marca Quimis.

Deionizador Water Pro PS, Labconco.

Reômetro HAAKE RS75 Rheostress acoplado a um banho termostatzado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3

4.2 Métodos Gerais

4.2.1 Manutenção do Microrganismo

O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* foi mantido em BDA (batata-dextrose-ágar) inclinado, a 4°C, feito repiques trimestrais.

4.2.2 Produção do botriosferana

A produção do botriosferana em glucose “EPS_{GLU}”, sacarose “EPS_{SAC}” e frutose “EPS_{FRU}”, como fontes de carbono, foi realizada no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina com a colaboração da professora Dra. Aneli de Melo Barbosa. Nessa etapa da pesquisa, objetivou-se somente a produção dos EPS segundo metodologia otimizada por Barbosa e colaboradores (2003) e STELUTI e colaboradores (2004), para ser alvo de futuras análises propostas nos objetivos dessa dissertação.

4.2.3 Cultivo estoque do *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05

O fungo foi mantido em meio sólido de ágar-batata dextrose (BDA) a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ com repiques trimestrais, como mostra a figura 10-A.

4.2.4 Cultivo do *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05

4.2.4.1 Pré-inóculo

Uma porção pequena das hifas do cultivo estoque de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi transferida para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel, glucose 10g/L e ágar 20 g/L (VGA). As placas foram incubadas por 5 dias à temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, conforme figura 10-B. Pequenas porções de hifas foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (125 mL) modificados, com quatro inserções na parede, contendo meio mínimo de Vogel e glucose 5g/L. O pré-inóculo foi mantido sob agitação constante de 180 rpm durante 48 horas à temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.4.2 Inóculo

O meio líquido contendo as células foi transferido para um *blender* autoclavado, onde o micélio foi homogeneizado por 30 segundos a velocidade máxima. O homogeinato foi transferido para tubos de centrífuga de fundo cônico, estéreis, e centrifugado durante 10 minutos a $5500 \times g$. O precipitado foi ressuspenso em solução salina fisiológica estéril de NaCl 0,9 % (p/v). A suspensão de células homogeneizadas foi diluída em salina estéril até se obter densidade óptica entre 0,4 e 0,5 a 400nm, o que corresponde a aproximadamente 200 a 260 μg de micélio/mL (BARBOSA et al., 2003, p.1695).

4.2.4.3 Preparo dos meios e cultivo

Os cultivos líquidos foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyer de 2000 mL contendo 400mL de meio de Vogel (1956) e 50 g/L de glucose ou sacarose ou frutose (individualmente), guardando a proporção ar/meio de 5:1. Para cada 100 mL de meio de cultivo foram utilizados 4 mL de inóculo, com densidade óptica padronizada. Os cultivos foram mantidos sob agitação constante a 180 rpm, por 72 horas, à temperatura de 28 ± 2 °C.

4.2.4.4 Interrupção do cultivo

Cada cultivo foi interrompido através de centrifugação por 25 minutos a $5500 \times g$, (Figura 10-C). O sobrenadante foi coletado sob banho de gelo para obtenção dos exopolissacarídeos (*botriosferana*) e o micélio foi reservado (Figura 10-D).

4.2.4.5 Isolamento dos exopolissacarídeos

O sobrenadante de cada cultivo (glucose, sacarose e frutose), conforme figura 10-E, contendo os exopolissacarídeos, foi precipitado em etanol (3 volumes), deixado durante 12 horas à temperatura de 4 °C (Figura 10-F), separado por centrifugação, solubilizado em água e dialisado contra água deionizada por 48 h à temperatura de 4 °C. Em seguida os EPS foram congelados (Figura 10-G) e liofilizados (Figura 10-H). Os liofilizados foram utilizados para estudos propostos neste trabalho.

Uma amostra de goma xantana, doada pela empresa “CPKelco”, foi utilizada como comparação em algumas análises efetuadas neste trabalho.

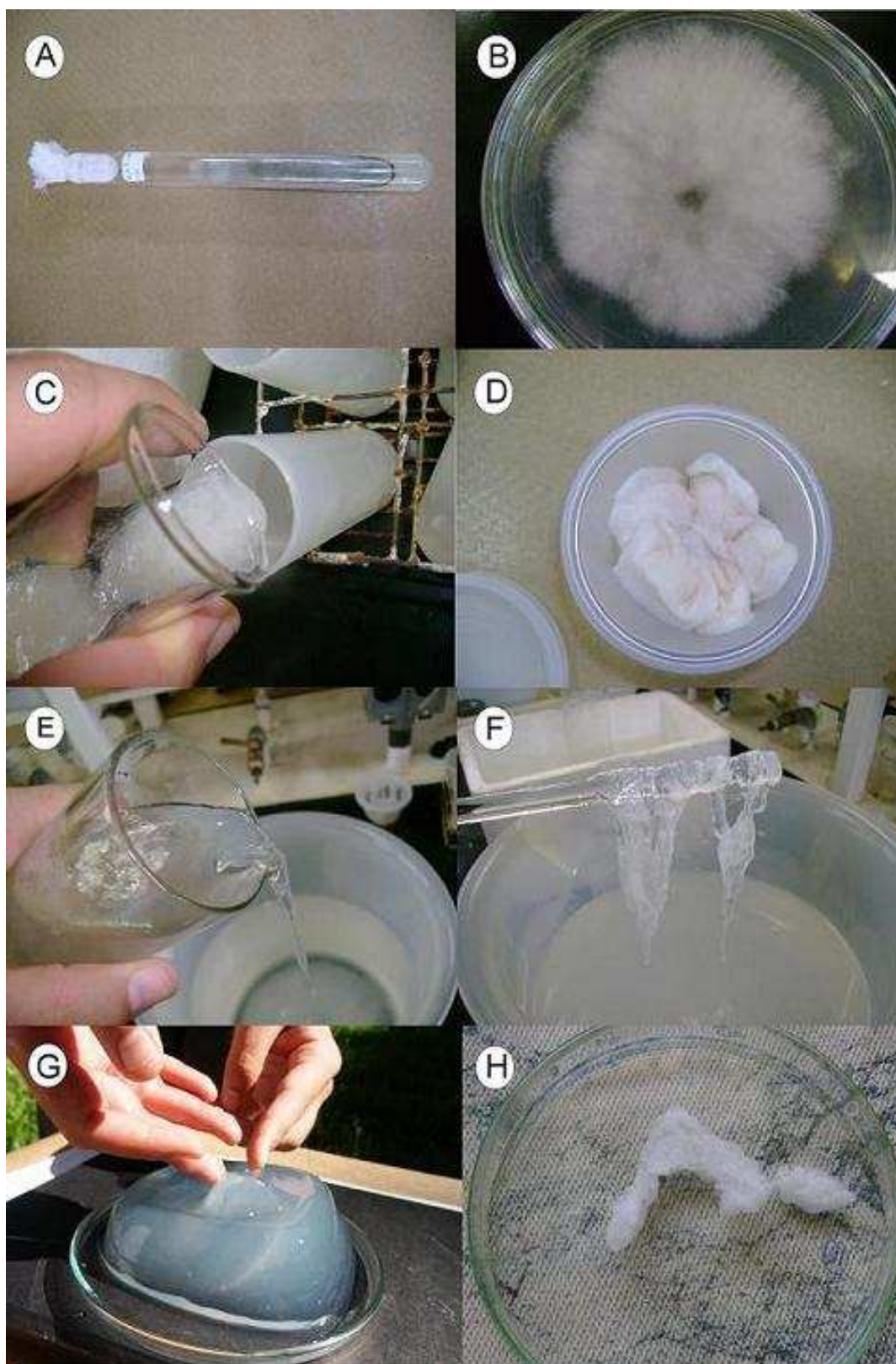


Figura 10 – Esquema de produção do botriosferana A) Cultivo estoque do *B. rhodina*; B) Pré-inóculo em meio (VGA), depois de 5 dias a 28 ± 2 °C; C) Interrupção do cultivo para posterior centrifugação do material “EPS e micélio”; D) Micélio separado após centrifugação do EPS; E) Sobrenadante após centrifugação, seguindo para precipitação em etanol; F) EPS precipitado em etanol; G) EPS solubilizado em água e resfriado; H) EPS liofilizado.

4.2.3 Análises quantitativas nos EPS_{GLU}, EPS_{SAC}, EPS_{FRU} e padrão xantana EPS_{XAN}

4.2.3.1 Determinação de açúcares totais - método do fenol - ácido sulfúrico

O método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS; GILLES; HAMILTON, 1956) foi utilizado para determinar a concentração de carboidrato total nos respectivos EPS (GLU, SAC, FRU, XAN). O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H₂SO₄ concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor amarela. Foi seguido o protocolo original do método, conforme descrito:

Reagentes: Solução de fenol 5% (m/v), H₂SO₄ concentrado.

Procedimento: Foi adicionado 0,5 mL da solução de fenol em 0,5 mL da amostra e, em um único jato, foram adicionados 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Após 10 minutos em repouso, foi feita a leitura espectrofotométrica a 480 nm.

Para calcular a concentração de carboidratos, foi realizada uma curva padrão de glucose (0,1 %), com faixa de sensibilidade de 10 a 100 µg.

4.2.3.2 Determinação dos açúcares redutores - método de Somogyi – Nelson

A presença de açúcar redutor nas amostras foi determinada pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Neste método, os açúcares redutores reduzem o reativo cupro-alcálico de Somogyi formando óxido cuproso, que na presença do reativo arseno-molibdico de Nelson forma um complexo de óxido de molibdênio de cor azul estável.

Reagentes: reativo arseno-molibdico de Nelson (NELSON, 1944) e reativo de Somogyi (SOMOGYI, 1945).

Procedimento: Em 0,5 mL da amostra contendo de 10 a 80 µg de açúcares redutores foi acrescentado 0,5 mL do reativo de Somogyi. Os tubos foram cobertos com pérolas de vidro, para evitar a evaporação do reativo, e levados a aquecimento em banho fervente por 10 minutos. Após, foi resfriado e adicionado 0,5 mL do reagente de Nelson e acrescentado 3,5 mL de água destilada. Os tubos foram agitados e lidos em espectrofotômetro em 540 nm.

Para calcular a concentração de açúcares redutores nas amostras foi utilizada uma curva padrão de glucose a 0,1%. A curva de calibração foi desenvolvida na faixa de concentração de 10 a 100 µg, de acordo com a estimativa do teor de carboidratos da amostra.

4.2.3.3. Determinação de proteínas - método de Bradford

A determinação da concentração de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante (Coomassie Blue G-250) com a proteína, formando um complexo de cor azul. O corante reage preferencialmente com resíduos de arginina e, em menor extensão, com resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina.

Solução estoque de corante: 40 mg de Coomassie Blue G-250 foram dissolvidos em 20 mL de etanol absoluto. Foram adicionados 40 mL de ácido fosfórico 85% e água destilada para completar 100 mL de solução.

Solução de uso: foi feita uma diluição (1:4, v/v) da solução estoque de corante em água destilada e, em seguida, filtrada em papel de filtro.

Procedimento: foi adicionado 1 mL da solução com o corante em 100 µL da amostra e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de calibração com albumina bovina (BSA), na faixa de concentração de 10 a 50 µg.

4.2.4. Cromatografia de filtração em gel em coluna Sepharose CL-4B

O gel Sepharose CL-4B é formado por agarose, numa concentração aproximada de 4%, estabilizado por pontes de hidrogênio. Possui faixa de fracionamento de $6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$ para proteínas e $10^4 - 1 \times 10^7$ para polissacarídeos.

Condição da coluna: A coluna de vidro (1,5x30 cm), preenchida com gel apresentou volume de 47 mL. Água destilada foi utilizada como eluente, sendo o fluxo de 0,5 mL/min e o volume coletado, por fração, de 1,5 mL.

Procedimento: 500 µg do material solubilizados em 1 mL de água destilada foram aplicados à coluna. O volume morto da coluna foi determinado pela aplicação do Blue dextran.

Para evitar contaminações entre os diferentes EPS analisados, foram utilizadas colunas exclusivas para cada amostra, procurando reproduzir as mesmas condições.

O experimento ocorreu em ambiente climatizado ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e as frações coletadas foram transferidas à temperatura de 4°C . Logo após foi determinado a quantidade de açúcar total de cada fração das amostras, assim montou-se o gráfico da corrida cromatográfica onde identificou o perfil da amostra.

4.2.5 Hidrólise Ácida Total

Preparo da Amostra: Alíquotas das amostras, contendo 50µg de açúcares totais, foram distribuídas em tubos próprios para hidrólise, congeladas e liofilizadas.

Hidrólise: A hidrólise ácida total foi efetuada pela adição de 300 µl de ácido trifluoracético (TFA) 5M à amostra seca, a seguir cada amostra foi solubilizados e o tubo foi selado e aquecido a 100°C por 16 horas (CORRADI da SILVA et al., 2005, p.12). O ácido foi removido por evaporação em evaporador rotativo (BUTCHI – R 114), com consecutivas trocas de H_2O deionizada até a evaporação total do ácido, e então solubilizadas em 500µl de H_2O deionizada, sendo posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica (HPAEC).

4.2.6 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica (HPAEC)

Para análise de monossacarídeos foi utilizado um sistema Dionex DX500 (cromatografia líquida de íons) e um detector de amperometria integrada (IAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros na forma de íons poliálcoxis, gerados na presença de solução aquosa de NaOH, foram separados isocraticamente, usando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4x250 mm) equipada com guarda coluna PA1, ao fluxo de 1 mL/min. As condições de eluição foram produzidas

utilizando H₂O deionizada (eluente 1) e NaOH 200 mM (eluente 2) preparada a partir de uma solução de NaOH 50%.

A coluna foi regenerada após 25 min de corrida com 100% do eluente 2, por 10 min, seguida pelo retorno às condições da corrida, por 15 minutos (para equilibrar a coluna), antes da injeção da amostra.

Procedimento: 25 µL de solução contendo 1 µg do material foi injetado no cromatógrafo, marca Dionex.

Padrões: Foi utilizado como padrão uma mistura de açúcares neutros contendo 200 ng/25 µL de cada um dos seguintes monossacarídeos: L-fucose, L-ramnose, D-galactose, D-glucose e D-manose totalizando 1µg/25µL de açúcares totais.

4.2.4 Análise da estrutura dos EPS

A verificação da conformação em tripla hélice nos EPS pode ser realizada através da complexação com o corante Congo Red, conforme descrito por Ogawa e colaboradores (1972).

Padrão utilizado: dextrana (65 a 74 kDa)

Procedimento: Preparou-se uma solução denominada CR/EPS misturando-se a solução de Congo Red e a solução de EPS na proporção de 1:10. Dez alíquotas de 1mL foram separadas e adicionou-se à solução CR/EPS, NaOH 5M e H₂O deionizada a fim de variar a concentração de NaOH de 0 a 0,4M em um volume final de 1,1 mL por tubo, como observado na tabela 2. A solução final resultante permaneceu em repouso por 3 horas: após esse tempo fez-se a varredura do espectro no intervalo de 470 a 540 nm.

Tabela 2 - Ensaio analítico para a formação do complexo CR/EPS.

TUBO	EPS/Congo Red	[NaOH] M	V(μL) de NaOH 5M	Água (μL)/ ensaio
1	1 mL	0	0	0
2	1 mL	0,05	10	90
3	1 mL	0,10	20	80
4	1 mL	0,15	30	70
5	1 mL	0,19	38	62
6	1 mL	0,21	42	58
7	1 mL	0,23	46	54
8	1 mL	0,25	50	50
9	1 mL	0,30	60	40
10	1 mL	0,40	80	20

4.2.5 Análises reológicas

As análises reológicas foram efetuadas em colaboração com a Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

4.2.5.1 Métodos reológicos

Os testes foram conduzidos à temperatura de 25°C para as análises em sistema estático e 5°C e 25°C para as análises em sistema dinâmico; o sensor utilizado foi o cone-placa (C60/2Ti°) (Figura 11-A).

Antecedendo as análises reológicas, foi efetuada a determinação da inércia do aparelho com o sensor em posição de análise, a fim de descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta, geradas durante os experimentos. Este procedimento se repetiu a cada troca de amostra. Os testes foram executados em triplicata e durante as análises a temperatura ambiente foi mantida a $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.5.2 Preparo das soluções de β glucanas

Para os experimentos de reologia, os biopolímeros (EPS_{GLU}, EPS_{SAC} e EPS_{FRU}) foram solubilizados (6g/L) em água deionizada aquecida (60°C) e mantidos nessa temperatura por um período de 15 minutos. Em seguida as amostras foram levadas à temperatura de 22°C, sob agitação mecânica constante, em velocidade média, por 18 horas. Durante esse período foram realizados mais dois ciclos de aquecimentos a 60°C, por 15 minutos. Após solubilização completa dos EPS (Figura 11-B), foram realizadas diluições para iniciar os experimentos.

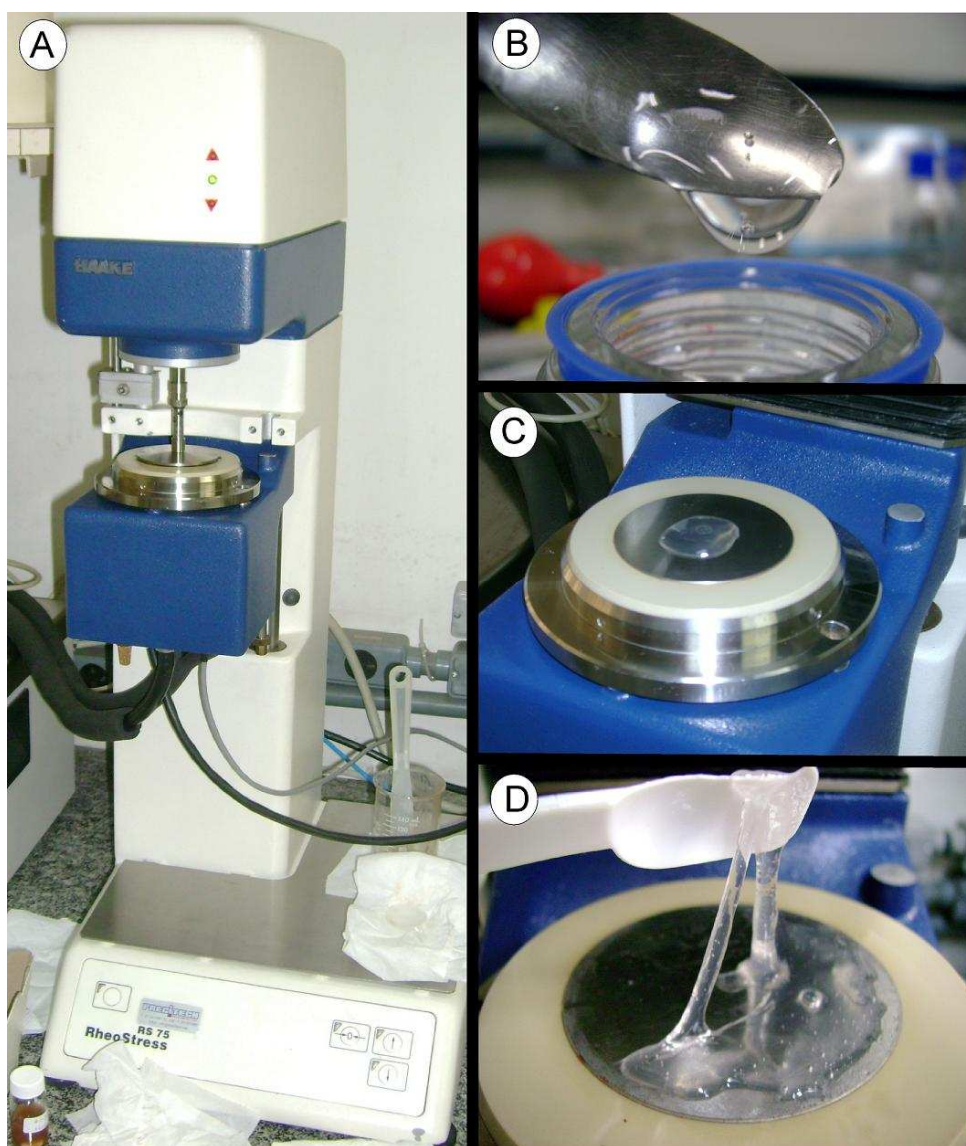


Figura 11 – (A) Reômetro HAAKE RS75 Rheostress; (B) Ilustração dos EPS solubilizados; (C) Amostra sobre a placa estacionária do reômetro (D) Exopolissacarídeos após varredura, a 5°C.

4.2.5.3 Determinação das viscosidades absolutas

O sensor cone-placa (C60/2Ti°) foi utilizado para analisar as soluções poliméricas em concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 g/L. Este instrumento consiste de uma placa plana inferior estacionária e um cone rotatório superior com diâmetro de 60mm e ângulo de 2° (α), como mostra a figura 12. O fluido permanece entre a placa e o cone sem espalhar-se, devido à tensão superficial, preenchendo inteiramente o espaço entre eles, de modo que as medições não sejam alteradas.

O cone atua em velocidades de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) controladas, e o arraste viscoso sob o cone rotativo exerce uma força de rotação que é proporcional à tensão de cisalhamento (τ).

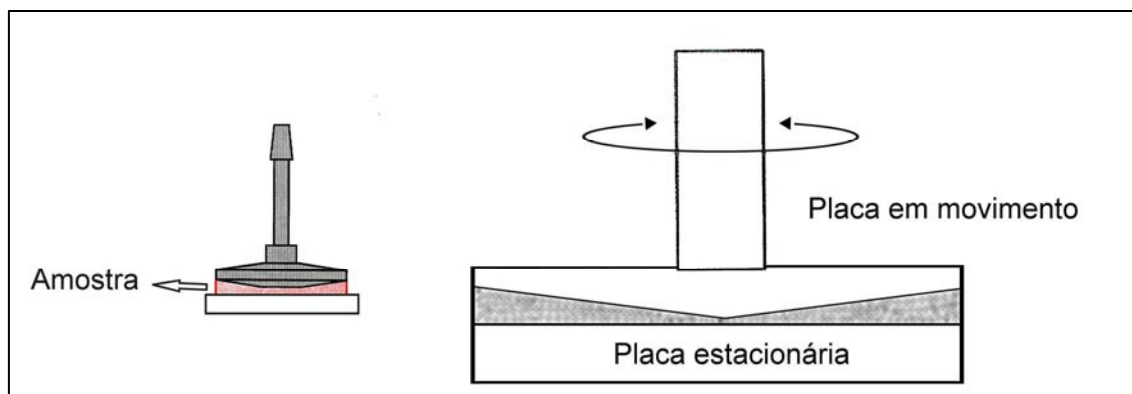


Figura 12 – Ilustração do sensor cone-placa utilizado no reômetro.

4.2.5.4 Curvas de fluxo

As curvas de fluxo (tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento) e de viscosidade (viscosidade x taxa de cisalhamento) foram realizadas em modo CR (Controlled Rate Rheometers) a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com variação da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) entre $0,001\text{ s}^{-1}$ até $500,0\text{ s}^{-1}$, no intervalo de tempo de 600 s, dessa forma foram medidas as mudanças na tensão de cisalhamento (σ) e na viscosidade (η) durante o fluxo. As análises foram realizadas em triplicata onde os dados foram coletados e tratados pelo software RHEOWIN.

4.2.5.5 Análise oscilatória em sistema dinâmico - Varredura de tensão e Varredura de Frequência

Esta análise foi realizada com a solução polissacarídica na concentração de 6g/L, sensor do tipo cone-placa (C60/2Ti°) em modo CS (Controlled Stress Rheometers), com variação da amplitude da tensão de 0,01 Pa até 10,0 Pa.

Devido à faixa de viscoelasticidade linear ser dependente da frequência, inicialmente o teste foi realizado três vezes com a frequência fixada em 0,1 Hz, 1 Hz e 10 Hz a fim de se determinar a região viscoelástica linear das amostras, isto é, a região em que os módulos elástico (G') e viscoso (G'') permanecem lineares e paralelos, sem variação com o aumento da deformação ($\dot{\gamma}$). Esta condição foi estabelecida para que não ocorram desvios dos modelos que descrevem o comportamento dos materiais, e para que a deformação causada não destrua as ligações internas temporárias de moléculas ou agregados, gerando perda de viscosidade e perda irreversível de parte da energia em forma de calor (MALKIN, 1994; SCHRAMM, 2006).

Após determinar a deformação dentro da região viscoelástica linear das amostras, foram realizadas as análises oscilatórias dinâmicas, por varredura de frequência, numa amplitude de 10^{-2} a 10 Hz. Foram medidos os valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência. Todas as análises foram efetuadas em triplicatas, nas temperaturas de 5°C e 25°C.

4.2.5.6 Rampa de temperatura

Para conhecer a influência da temperatura sobre o comportamento reológico das amostras, foram realizadas medidas no sistema oscilatório, com variações de temperatura entre 5 a 95°C (1,5 °C / min) por 60' e de 95°C para 5°C, também por 60 minutos, na frequência de 1 Hz e tensão de 1,0 Pa. Para essa análise utilizou-se o reômetro citado no item (4.4.1), acoplado a um sistema controlador de temperatura, denominado sistema Peltier (TC81). Todas as análises foram realizadas em triplicatas na concentração de 6 g/L, para cada EPS.

4.2.5.7 Tixotropia

A determinação da tixotropia foi efetuada em sensor cone-placa (C60/2Ti°) na concentração de 6 g/L, para cada EPS. Foi realizada a curva de histerese ($\tau \times \dot{\gamma}$) com variação da taxa de cisalhamento de 10^{-1} a 10^2 s^{-1} , no intervalo de tempo de 300 s, então a taxa de cisalhamento foi mantida no limite superior durante 60s para quebra da estrutura tixotrópica, seguido da variação da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) de 10^2 s^{-1} a 10^{-1} , em 300 s. onde se verificou a subida (ascendente) e a descida (descendente) da curva. As análises foram realizadas em triplicata à temperatura de 25°C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção e quantificação dos exopolissacarídeos produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* em três diferentes fontes de carbono.

A produção de polissacarídeos por microrganismos pode ser influenciada por alguns parâmetros tais como: temperatura, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, aeração, agitação e a presença de micro elementos. Esses parâmetros podem determinar diferenças no rendimento da produção dos exopolissacarídeos (EPS) bem como nas características químicas e reológicas dessas moléculas (BARBOSA et al., 2004).

No trabalho efetuado por Steluti e colaboradores (2004) o fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi cultivado para produção de um exopolissacarídeo denominado botriosferana, em diferentes fontes de carbono. Dentre as fontes utilizadas aqueles produzidos em glucose, frutose e sacarose, foram selecionados para a determinação de suas estruturas químicas. A melhor produção de botriosferana foi utilizando a sacarose comercial como fonte de carbono.

Corradi da Silva e colaboradores (2005) caracterizaram o botriosferana produzido em sacarose e frutose como fonte de carbono e o compararam àquele anteriormente estudado por Barbosa e colaboradores (2003). De acordo com esses autores, independentemente da fonte de carbono utilizada, a cadeia principal do botriosferana é constituída por unidades glucopiranosídicos $\beta(1\rightarrow3)$ ligados com substituição em C-6 por unidades glucopiranosídicas e/ou gentiobiosídicas (glucose $\beta1\rightarrow6$ glucose). A principal diferença encontrada entre os três EPS está no grau de ramificação e/ou na proporção relativa desses substituintes. O EPS produzido em glucose apresentou um percentual de ramificação de 22%, o qual foi semelhante àquele produzido em sacarose (21%). A diferença básica observada entre eles foi uma maior proporção de unidades gentiobiosídicas no EPS_{GLU}. O EPS produzido em frutose foi o mais ramificado (31%), apresentando uma ramificação a cada três unidades de glucose da cadeia principal e uma proporção de unidades de gentiobiose semelhante àquela encontrada no EPS_{GLU}. Esses resultados demonstram que modificações no meio de cultivo não alteram a cadeia principal do polímero, mas possibilitam mudar o grau de substituição da unidade repetitiva e provavelmente, da massa molecular.

Considerando os resultados da caracterização química do botriosferana nessas três fontes de carbono e a possibilidade de aplicação dessas moléculas nos diferentes

setores da indústria, esse trabalho tem como meta efetuar alguns estudos físico-químicos das soluções polissacarídicas dos EPS produzidos em glucose, frutose e sacarose, como fontes de carbono, denominados de EPS_{GLU}, EPS_{FRU} e EPS_{SAC}.

As macromoléculas foram produzidas e separadas do meio de cultivo de acordo com a metodologia estabelecida por Steluti e colaboradores (2004). Após diálise exaustiva os EPS foram liofilizados e pesados (Tabela 3). Para confirmar a massa real em carboidratos, alíquotas foram retiradas e quantificadas para açúcares totais pelo método de Dubois (1956). A ausência do açúcar utilizado com fonte de carbono foi confirmada pelo baixo teor de açúcar redutor, obtido pelo método de Somogy (1945) e Nelson (1944). Apesar dos resultados dessa análise não contribuírem para o EPS produzido em sacarose, pois é um açúcar não redutor, ela também foi efetuada (Tabela 3). A quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) foi realizada para determinar a presença de um provável contaminante do exopolissacarídeo, de origem protéica, excretado pelo fungo no meio de cultivo.

Os resultados para açúcares totais e proteínas encontrados no EPS cultivado em glucose (95,5% e 4,5%) foram, respectivamente, superior e inferior àqueles (86% e 14%) descritos por Barbosa e colaboradores (2003). Isto se deve, provavelmente, a concentração de glucose utilizada (5%) neste trabalho que pode ter atuado como repressor catabólico da enzima lacase, secretada no meio de cultivo (DEKKER et al., 2001). Esta hipótese pode ser aceita desde que a redução de proteína acompanha o aumento da concentração de fonte de carbono.

Para os EPS produzidos em frutose e sacarose os resultados de açúcares totais e proteínas (Tabela 3) foram similares àqueles descritos por Corradi da Silva e colaboradores (2005) e, neste caso, as condições de cultivo foram exatamente iguais.

Tabela 03 – Produção final dos EPS (liofilizados) e as quantificações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas dos polissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina*, em três fontes de carbono.

	Açúcar Total (g)	Açúcar Redutor (g)	Proteínas (g)	Açúcar Total (%)	Proteínas (%)
EPS _{GLU}	2,71	0,052	0,127	95,50	4,50
EPS _{SAC}	2,03	0,010	0,174	92,80	7,20
EPS _{FRU}	3,40	0,013	0,116	96,60	3,40
*EPS _{XAN}	0,75	0,010	0,045	94,25	5,75

*EPS_{XAN} – valores das quantificações de açúcares totais, proteína e açúcares redutores em 1g do padrão de goma xantana.

Fariña e colaboradores (2001) quantificaram açúcares totais, açúcares redutores e proteínas da escleroglucana, uma $\beta(1\rightarrow3; 1\rightarrow6)$ -D-glucana excretada pelo fungo *Sclerotium rolfsii*. Os resultados encontrados para essas análises foram 98% de açúcares totais e 2% de proteínas. Esses valores estão muito próximos aos encontrados nos exopolissacarídeos produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.

5.2 Verificação da homogeneidade dos exopolissacarídeos por cromatografia de filtração em gel

A análise da homogeneidade dos EPS foi realizada por cromatografia de gel permeação. Os métodos cromatográficos são os mais utilizados para esse fim e, em particular, a cromatografia de filtração em gel, que separa as moléculas de acordo com a sua massa molecular aparente. Este processo baseia-se na ordem de eluição que é diretamente proporcional ao tamanho das moléculas (BOYER, 1993).

O perfil de eluição da amostra na corrida cromatográfica nos informa a pureza do material bem como peso molecular aparente. Isto porque, dependendo da forma do polissacarídeo, se em hélice tripla, hélice simples ou conformação ao acaso (randômica), ele

pode ou não entrar nos poros do gel e retardar ou acelerar o seu percurso na fase móvel, dando a impressão que a molécula tem determinado peso molecular.

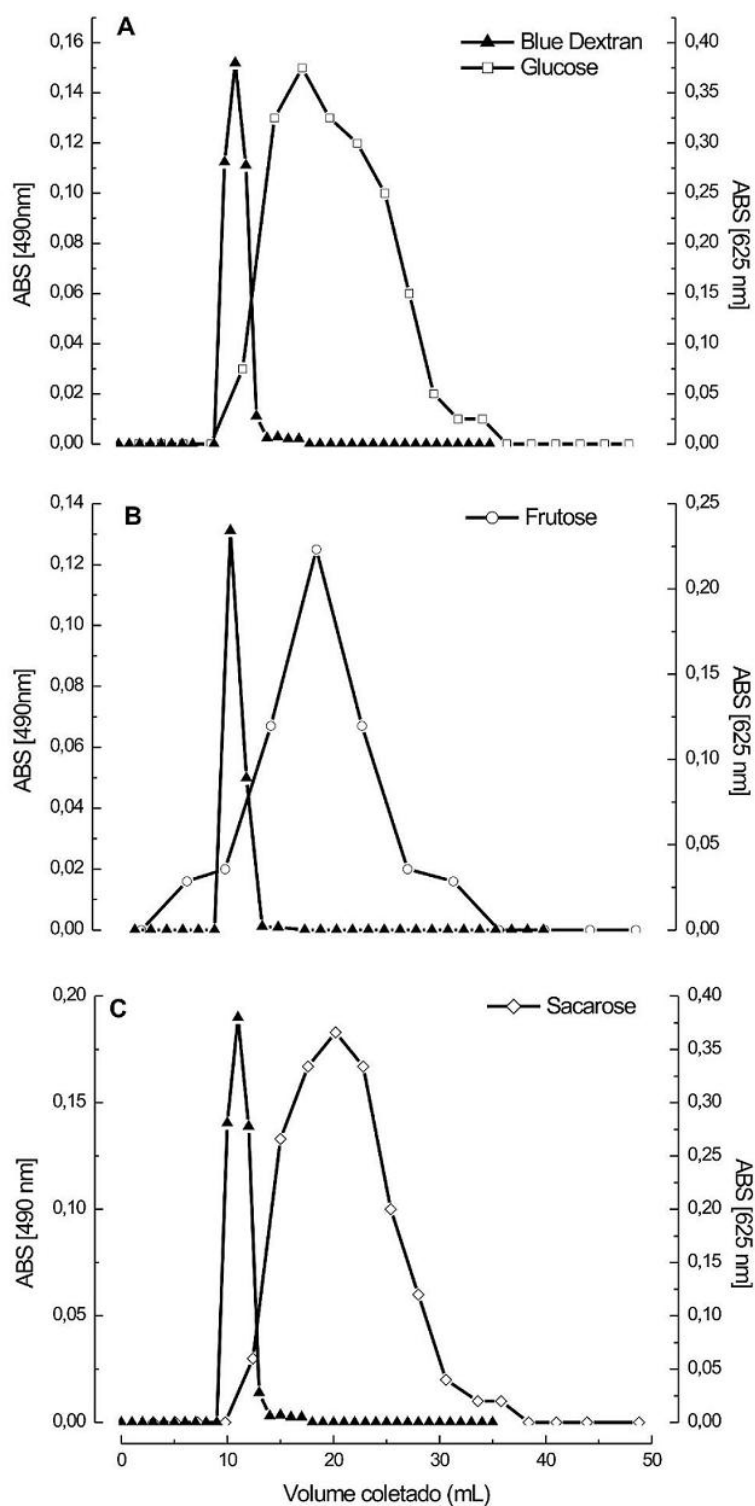


Figura 13 - Cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL – 4B dos exopolissacarídeos produzidos em glucose, frutose e sacarose. Total de EPS aplicado: 2,0 mg; fluxo: 0,3 mL/min; eluente: H₂O; volume da fração: 2,6 mL para EPS_{GLU} e EPS_{SAC} e 2,9 mL para EPS_{FRU}; volume da coluna: 30,0 mL.

Portanto, nos métodos cromatográficos à pressão normal, para os polissacarídeos, podemos apenas inferir sobre o grau de pureza da amostra (homogeneidade) pelo número de picos e sobre a polidispersividade do material, através da forma do pico.

De acordo com essa informação os resultados encontrados na cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B mostram que os EPS produzidos nas três fontes de carbono estão aparentemente homogêneos, embora polidispersos (Figura 13). A polidispersividade é uma característica das macromoléculas cujo processo de síntese não obedece a um molde genético, como é o caso dos polissacarídeos. Além disso, a possibilidade de grandes e diferentes arranjos macromoleculares transforma esses biopolímeros em famílias de elevadas massas moleculares e consequentemente, polidispersas.

Uma forma mais apropriada e, relativamente, atual para determinar o grau de homogeneidade e polidispersividade é a utilização da cromatografia por exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz laser de multi-ângulos (MALLS). A utilização de colunas seqüenciadas com géis de diferentes porosidades, pressão elevada e detectores sensíveis permitem, pela mudança da fase móvel (H₂O; solução de NaCl; solução diluída de NaOH e dimetil sulfóxido - DMSO), se chegar ao peso molecular absoluto bem como a soluções poliméricas de menor grau de polidispersividade (WYATT, 1993).

Após a obtenção e a determinação da homogeneidade, dos exopolissacarídeos a próxima etapa é determinar a composição monossacarídica da macromolécula, que tanto pode ser efetuada por hidrólise enzimática quanto por hidrólise ácida (PAZUR, 1994).

5.3 Hidrólise ácida total e análise por HPAEC/PAD dos exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina* nas diferentes fontes de carbono

A estrutura primária de um EPS é definida pela composição monossacarídica, conformação, posição da ligação glicosídica, entre outras características (RAO et al., 1998).

A determinação da estrutura primária consiste na despolimerização total ou parcial, por hidrólise ácida ou enzimática, e estes tratamentos produzem, respectivamente, monossacarídeos ou oligossacarídeos que são posteriormente analisados por cromatografia líquida de íons em alta pressão (HPAEC – high performance anionic exchange

chromatography) acoplada a um detector de óxido-redução (amperometria integrada ou pulsada – PAD).

Para a determinação da composição monossacarídica, os EPS produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e o padrão de xantana foram submetidos à hidrólise ácida total (TFA 5M, 100°C, 16 h) e analisados por HPAEC. Os hidrolisados dos três EPS eluíram como um único pico com tempo de retenção (R_T) de 14,08 minutos semelhante à glucose contida numa mistura de monossacarídeos, denominada mistura padrão (Figura 14). A goma xantana, que será utilizada como padrão, após hidrólise em condições semelhantes aos EPS, apresentou dois picos com tempos de retenção de 14,08 e 15,50 minutos equivalentes aos R_T dos padrões de glucose e manose, respectivamente (Figura 14). Segundo Garcia-Ochoa e colaboradores (2000) a goma xantana é um heteropolímero constituído por glucose, manose e ácido glucurônico. O ácido glucurônico, presente no polissacarídeo xantana, não foi detectado na análise porque para ser liberado do polímero há necessidade de condições mais severas de hidrólise, experimento não efetuada neste trabalho (PAZUR, 1994).

O polissacarídeo xantana passará a ser utilizado como padrão para comparação de seus resultados àqueles encontrados para os exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina*, nas diferentes fontes de carbono. A escolha do heteropolímero se deve, principalmente, às inúmeras informações disponíveis na literatura científica tanto em relação à reologia quanto à sua aplicação (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO; 2004; HIGIRO; HERALD; ALAVI, 2006).

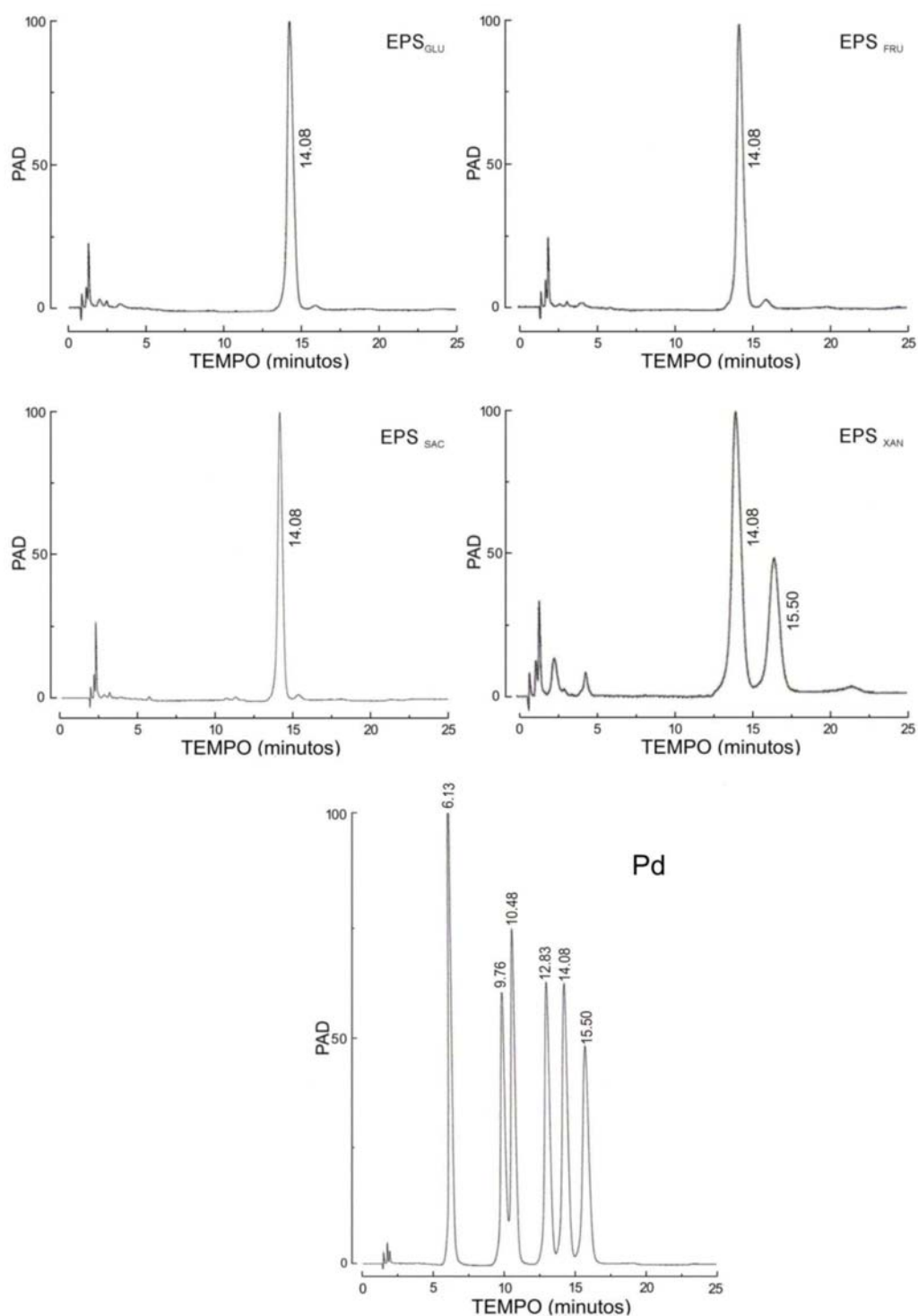


Figura 14 - Análise dos monossacarídeos provenientes da hidrólise ácida dos EPS_{GLU}, EPS_{SAC}, EPS_{FRU} e EPS_{XAN} por HPAEC/PAD. Padrões de açúcares neutros (Pd), com tempos de retenção em minutos: fucose (6,13); arabinose (9,76) rhaminose (10,48); galactose (12,83); glucose (14,08); manose (15,50). Condições da corrida: isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 5M, 16 horas, 100 °C. Quantidade de material: 50 µg.

5.4 Análise da conformação dos exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina*, em diferentes fontes de carbono

Algumas características físico-químicas das glucanas β -D-(1 $\rightarrow$ 3) e β -D-(1 $\rightarrow$ 3:1 $\rightarrow$ 6) estão relacionadas com a estrutura em hélice tripla, importantes para a atividade biológica (ZHANG et al., 2007) e para a viscosidade (DONG; JIA; FANG, 2006). A manutenção dessa estrutura se deve às ligações de hidrogênio existentes inter e intra molecularmente (PALLESCHI et al., 2005, p.2154). A hélice tripla pode variar pelo aumento da força iônica, da alcalinidade do meio e da temperatura ou através do uso de um solvente aprótico como o DMSO. Essas alterações enfraquecem as ligações de hidrogênio e determinam uma mudança na conformação de tripla hélice para hélice simples ou ao acaso (randômica) (FALCH et al., 2000, p.588).

Segundo Ogawa e colaboradores (1972) a mudança da conformação pode ser acompanhada pela formação de um complexo entre o corante Congo Red e o polissacarídeo, em diferentes concentrações de NaOH. A relação entre o complexo (CR/EPS), a conformação e o pH pode ser acompanhada pela mudança do comprimento de onda máximo (λ_{MAX}) em cada uma das concentrações de NaOH. Para concentrações entre 0,1 e 0,19M de NaOH ocorre a perda gradual da rigidez da estrutura, reduzindo a viscosidade e facilitando a complexação com o Congo Red. Em concentrações superiores, entre 0,19 a 0,24M inicia-se a quebra das ligações de hidrogênio dando início a transição da conformação helicoidal para randômica, perdendo assim a capacidade de formar complexos com o corante. Em concentrações acima de 0,24M há predominância da conformação randômica.

A complexação com o Congo Red, específica para glucanas β -D-(1 $\rightarrow$ 3) e β -D-(1 $\rightarrow$ 3:1 $\rightarrow$ 6) pode ser visualizada para os EPS produzidos pelo *B. rhodina* nas três diferentes fontes de carbono, indicando a presença de conformação em hélice tripla com os maiores deslocamentos de λ_{MAX} (Figura 15). A goma xantana que é uma β (1 $\rightarrow$ 4)-D-glucana com ramificação em O-3 por resíduos de manose e ácido glucurônico e a dextrana, que é um α (1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana têm estruturas químicas incompatíveis com a formação da hélice tripla (RINAUDO et al., 1999) e, portanto, não há formação do complexo e, conseqüentemente, do deslocamento do λ_{MAX} (Figura 13).

Segundo alguns autores (GARCIA-OCHOA et al., 2000; DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004) a goma xantana pode ser encontrada como hélice simples, dupla ou tripla, entretanto em nossos experimentos não houve formação do

complexo Congo Red/Xantana indicando a inexistência de estrutura em tripla hélice para esse polissacarídeo.

Para os exopolissacarídeos estudados, concentrações entre 0,1 e 0,19M de NaOH mostraram que a quantidade de hélice é maior para o EPS_{SAC} seguida do EPS_{GLU}. Esses resultados são coerentes quando comparados àqueles encontrados na caracterização química dessas moléculas (BARBOSA et al., 2003, CORRADI da SILVA et al., 2005) que têm 21 e 22% de ramificação, respectivamente; além disso, o EPS obtido em glucose tem uma maior quantidade de unidades gentiobiosídicos ligados à cadeia principal, os quais podem impedir estericamente a proximidade das cadeias polissacarídicas para efetuarem as ligações de hidrogênio e consequentemente formarem a hélice tripla (Figura 15).

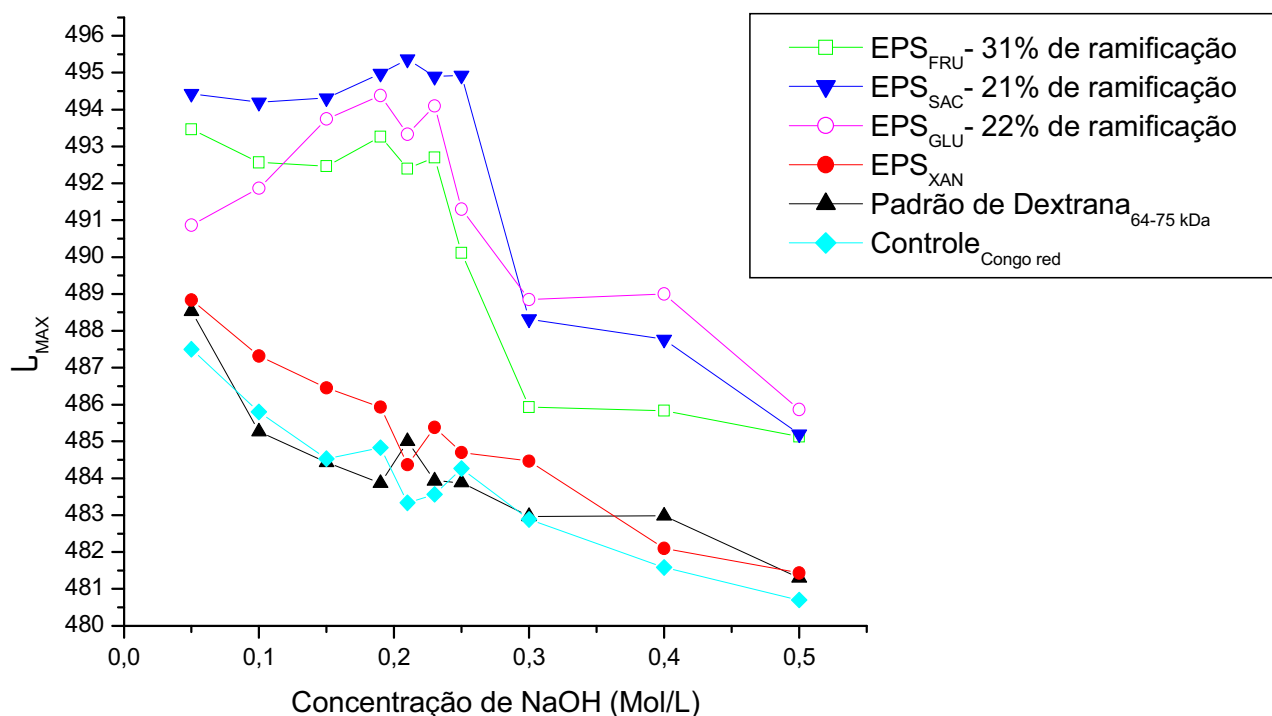


Figura 15 - Análise conformacional do EPS produzidos em diferentes fontes de carbono (glucose “EPS_{GLU}”, sacarose “EPS_{SAC}”, frutose “EPS_{FRU}” e o padrão de goma Xantana “EPS_{XAN}”)

Para a mesma faixa de concentração de NaOH, o EPS_{FRU}, com maior grau de ramificação (31%) formou um complexo de cor menos intensa indicando que, provavelmente, a presença das ramificações impede a hélice tripla bem como a formação do complexo CR/EPS. Esse argumento pode ser aceito uma vez que a transição da conformação helicoidal para randômica ocorre em menores concentrações de NaOH, quanto maior o grau de ramificação, menor a quantidade de hélice tripla.

Uma variedade de *B. rhodina* DABAC P82 produtora de β -glucana, foi investigada por Moresi e colaboradores (2003). Nos experimentos efetuados com o complexo Congo Red e o EPS foi confirmada a presença de tripla hélice pela formação do complexo entre 0,05 – 0,20M de NaOH. A grifolana, uma $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucana produzida pelo fungo *Grifola frondosa* apresentou tripla hélice, quando se avaliou a relação complexo Congo Red/EPS (MAO; HSU; HWANG, 2007). Outros autores também confirmam a presença de tripla hélice em β -D-glucanas pela formação do complexo com o corante Congo Red (RAMESH; THARANATHA, 1998; CHENGHUA et al., 2000; DONG; JIA; FANG, 2006; ROUT et al., 2008).

5.5 Análise Reológicas

Após caracterização química dos exopolissacarídeos produzidos pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (BARBOSA et al., 2003; CORRADI da SILVA et al., 2005), foram efetuados estudos reológicos dos polissacarídeos considerando-se a viscosidade relativamente elevada de suas soluções, mesmo em baixas concentrações. O conhecimento das propriedades reológicas dos polissacarídeos é importante, uma vez que eles se apresentam como fonte potencial para futuras aplicações em diferentes setores da indústria.

5.5.1 Curvas de fluxo

A curva de fluxo, definida a partir das medidas de tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) permite verificar o comportamento de fluxo das soluções polissacarídicas. A partir da construção do reograma é possível estabelecer se um líquido apresenta um comportamento de fluxo Newtoniano ou não Newtoniano, em determinadas condições de tensão ou taxa de cisalhamento. Um líquido Newtoniano é representado, graficamente, por uma reta com início na origem da curva de fluxo. Os líquidos que não exibem esse comportamento de fluxo são chamados de não Newtonianos. A análise de reogramas com diferentes concentrações poliméricas permite evidenciar a transição de um comportamento Newtoniano para não-Newtoniano.

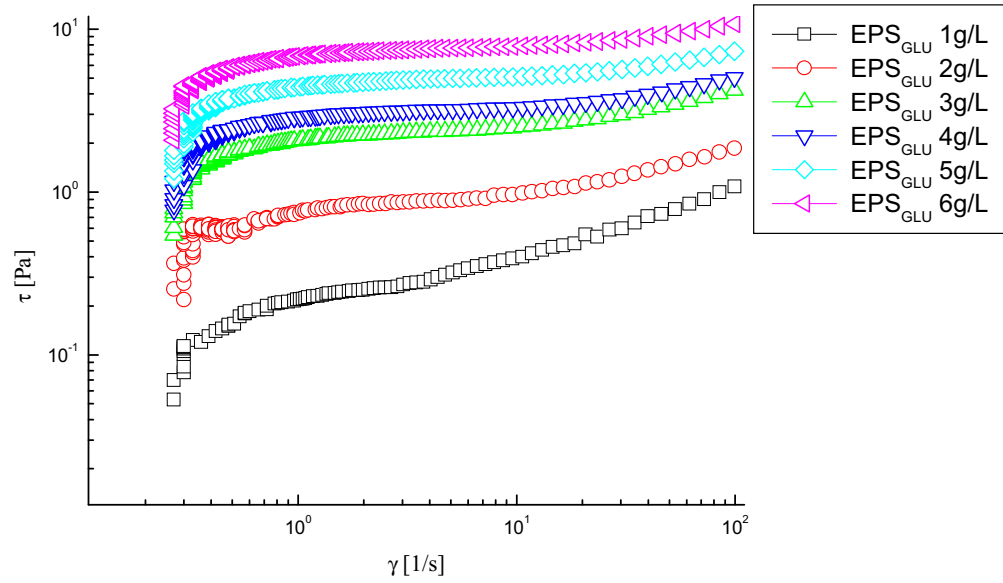


Figura 16 – Curva de fluxo, tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS_{GLU}, nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25°C.

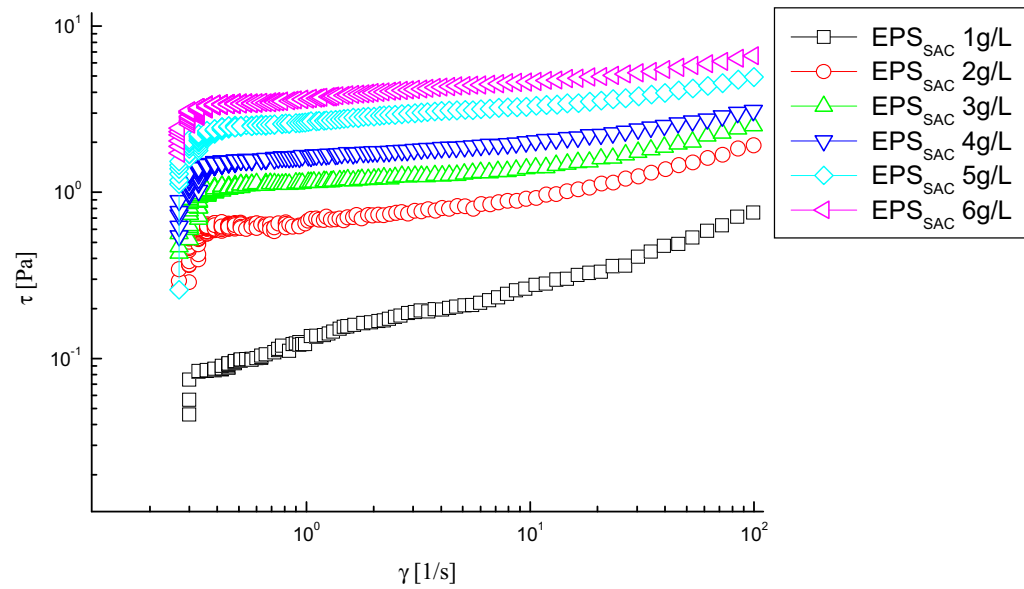


Figura 17 – Curva de fluxo, tensão de cisalhamento (τ) versus a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS_{SAC}, nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25°C.

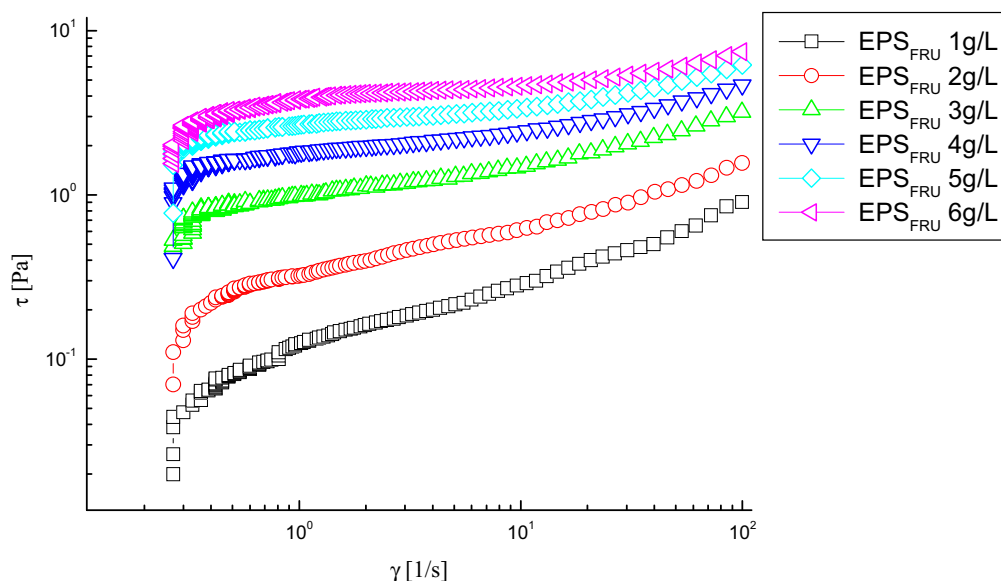


Figura 18 – Curva de fluxo, tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS_{FRU}, nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25°C.

O perfil encontrado nas figuras 16, 17 e 18 permite estabelecer que as soluções polissacarídicas têm comportamento de fluxo de líquidos não Newtonianos. Mais ainda, o aumento da tensão de cisalhamento, a partir do aumento progressivo da taxa de cisalhamento, caracteriza as soluções como fluidos pseudoplásticos (NAVARRO, 1997).

Rottava (2005) observou comportamento semelhante de pseudoplasticidade para a goma xantana, produzida por diferentes espécies da bactéria *Xanthomonas* sp. Bae e colaboradores (2008) estudaram o comportamento reológico das soluções do exopolissacarídeo levana, produzido pela *Microbacterium laevaniformans*, e os resultados encontrados permitiram concluir que essas soluções também apresentavam comportamento pseudoplástico.

5.5.2 Curvas de viscosidade

A viscosidade, que descreve a propriedade física de um líquido em resistir ao fluxo induzido pelo cisalhamento, pode depender de alguns parâmetros tais como temperatura, a natureza física da substância, pressão, taxa de cisalhamento, entre outros. Os diferentes tipos de curva de fluxo têm seus correspondentes tipos de curvas de viscosidade,

que no caso dos líquidos Newtonianos, são representadas por uma reta paralela à abscissa, indicando que independente da taxa de cisalhamento, a viscosidade não se modifica. Fluidos que sofrem diminuição da viscosidade, quando a taxa de cisalhamento aumenta, são chamados pseudoplásticos (SCHRAMM, 2006).

As curvas de viscosidade para os EPS produzidos nas diferentes fontes de carbono, estão apresentadas nas figuras 19, 20 e 21. As medidas da viscosidade absoluta (η) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) efetuadas em concentrações de 1 a 6 g/L foram reunidas em um único gráfico, para cada um dos EPS estudados.

A partir das figuras 19, 20 e 21 é possível observar que a viscosidade aumenta com o aumento da concentração dos polímeros, esse comportamento foi notado visualmente nos três exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina*, conforme figura 22. Também, de acordo com as curvas de viscosidade, os três polissacarídeos estudados apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, as viscosidades das soluções polissacarídicas em todas as concentrações analisadas decresceram de maneira substancial com o aumento da taxa de deformação.

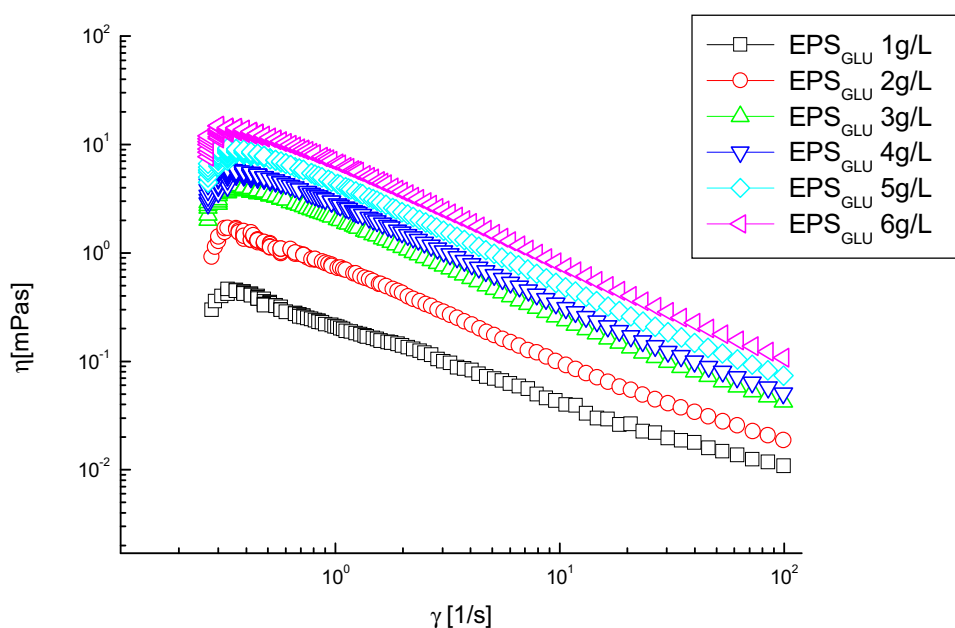


Figura 19 – Viscosidade absoluta (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS_{GLU}, nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25°C.

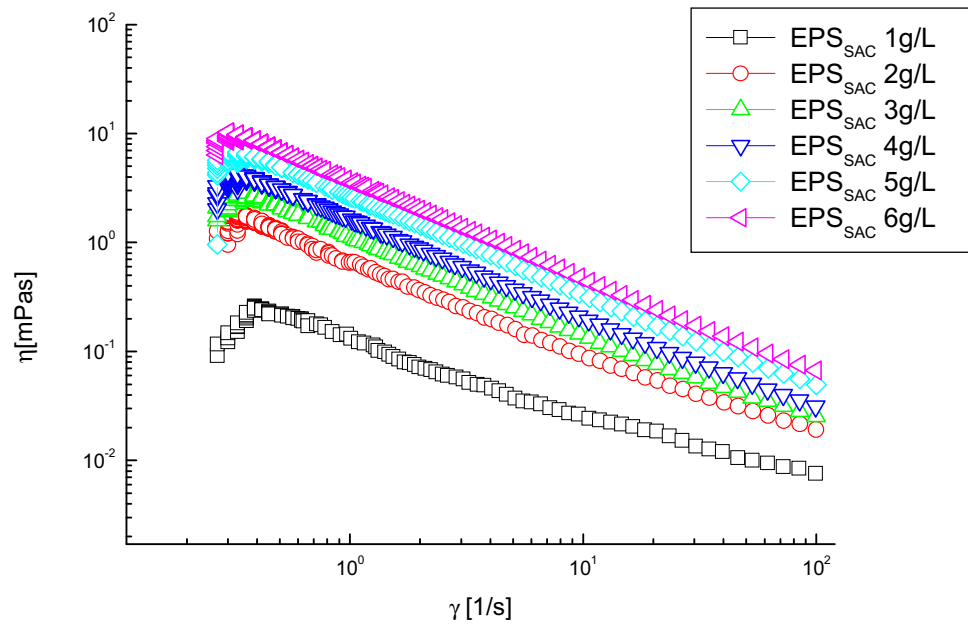


Figura 20 – Viscosidade aparente (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS_{SAC}, nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25°C.

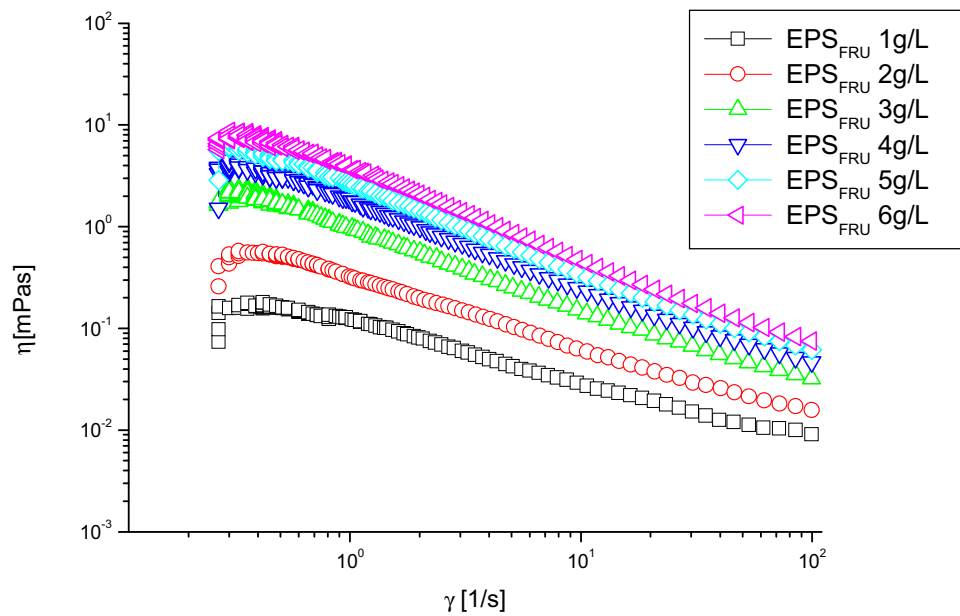


Figura 21 – Viscosidade aparente (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) do EPS_{FRU}, nas concentrações de 1 a 6g/L. Em sistema aquoso a 25°C.

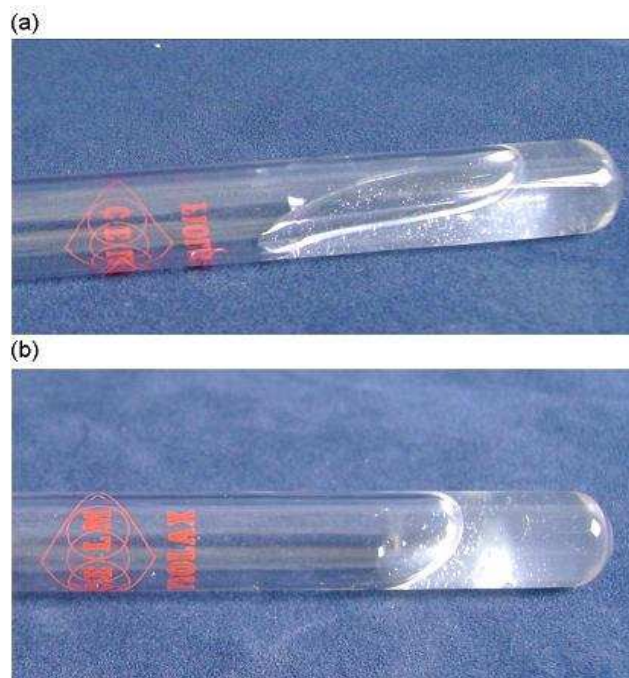


Figura 22 - Soluções aquosas do EPS_{GLU} á temperatura de 25°C. (a) 3g/L e (b) 6g/L.

De acordo com Schramm (2006) soluções poliméricas com longas cadeias entrelaçadas e enoveladas quando em repouso, têm suas moléculas numa ordem interna irregular que se caracteriza por uma considerável resistência interna ao fluxo, ou seja, uma elevada viscosidade. Com o aumento das taxas de cisalhamento, há uma ordenação ou alinhamento das partículas, na direção do fluxo, provavelmente por ter as interações desfeitas. Além disso, ainda segundo o mesmo autor, o cisalhamento também pode induzir a quebra de agregados, auxiliando o material a escoar mais rapidamente.

O comportamento de pseudoplasticidade também foi encontrado em soluções de outros polissacarídeos microbianos (COVIELO et al., 2007; TONELI; MURR; PARK, 2005; SUTHERLAND, 2001).

A pseudoplasticidade dos polissacarídeos em estudo permite antever a possibilidade de aplicação industrial à semelhança da goma xantana, que é o biopolímero mais utilizado pela indústria, pois apresenta propriedades de espessante e estabilizante, com comportamento pseudoplástico estável em uma larga faixa de pH, concentração iônica e temperatura (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Marcotte e colaboradores (2001) realizaram estudos das propriedades reológicas de alguns hidrocolóides (carragenana, pectina, gelatina, amido e xantana), sob diferentes concentrações (1 a 6%, dependendo do tipo de hidrocolóide) e temperaturas (20,

40, 60 e 80°C). Os autores verificaram a dependência das características reológicas com a concentração e a temperatura, que se mostrou variável de um hidrocolóide para o outro. Entretanto, para todos os hidrocolóides, a pseudoplasticidade aumentou com o aumento da concentração. Resultados semelhantes foram encontrados para as soluções polissacarídicas do *B. rhodina*.

Soluções de goma com valores elevados de η (TONELI; MURR; PARK, 2005), ou seja, com comportamento altamente pseudoplásticos, imprimem uma sensação de viscosidade na boca. Desse modo, características de elevada viscosidade proporcionam uma sensação de maciez e umidade ao paladar “*mouthfeel*”, que podem ser desejáveis em algumas formulações alimentícias. A escolha da goma para utilização industrial deve ser, portanto, de um sistema que possua um comportamento altamente pseudoplástico (CORRÊA et al., 2005).

A presença de sais inorgânicos é um fator modificador da viscosidade nas soluções polissacarídicas, ou seja, a adição de sais pode incrementar ou diminuir a viscosidade da solução (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004). Com intuito de avaliar o comportamento reológico dos três exopolissacarídeos na presença de solução salina, foi realizada uma curva de viscosidade dos EPS, solubilizados em solução de NaCl (1g/L). As curvas de viscosidade foram realizadas com as soluções na concentração de 6g/L, à temperatura de 25°C (Tabela 4 e Figura 23).

Tabela 4 – Viscosidade absoluta das soluções aquosa e salina dos EPS_{GLU}, EPS_{SAC} e EPS_{FRU}, 6g/L, nas taxas de cisalhamentos ($\dot{\gamma}$) 1,02; 10,59 e 99,59(1/s), à temperatura de 25°C.

		Viscosidade (mPas)		
		1,02(1/s)*	10,59(1/s)*	99,59(1/s)*
EPS _{GLU}	H ₂ O	6,70	0,74	0,11
	NaCl (1g/L) em H ₂ O	1,40	0,11	0,04
EPS _{SAC}	H ₂ O	3,56	0,44	0,07
	NaCl (1g/L) em H ₂ O	2,35	0,29	0,04
EPS _{FRU}	H ₂ O	3,64	0,43	0,07
	NaCl (1g/L) em H ₂ O	1,54	0,22	0,04

* taxa de cisalhamento

Comparando-se os resultados da viscosidade dos biopolímeros em solução aquosa (6g/L), é possível observar que os maiores valores encontrados são para o EPS_{GLU} (Tabela 4), independente da taxa de cisalhamento aplicada. O EPS_{FRU} apresentou maiores valores de viscosidade que o EPS_{SAC} na taxa de cisalhamento 1,02 (1/s), observando uma inversão em 10,59 (1/s).

É também possível observar, a partir da tabela 4, que os EPS solubilizados em solução aquosa de NaCl (1g/L) apresentaram menor viscosidade quando comparados com os respectivos polímeros dissolvidos apenas em água. Resultados semelhantes foram encontrados por BERWANGER (2005), quando estudou a viscosidade do biopolímero produzido pela bactéria *Sphingomonas capsulata* em solução salina. Apesar de ser o EPS_{GLU} o mais viscoso em meio aquoso, foi o menos viscoso em solução aquosa contendo NaCl, provavelmente devido ao maior percentual de resíduos gentiobiosídicos (16%) em sua estrutura, seguido dos EPS_{FRU} (15%) e EPS_{SAC} (9%) (Figura 23).

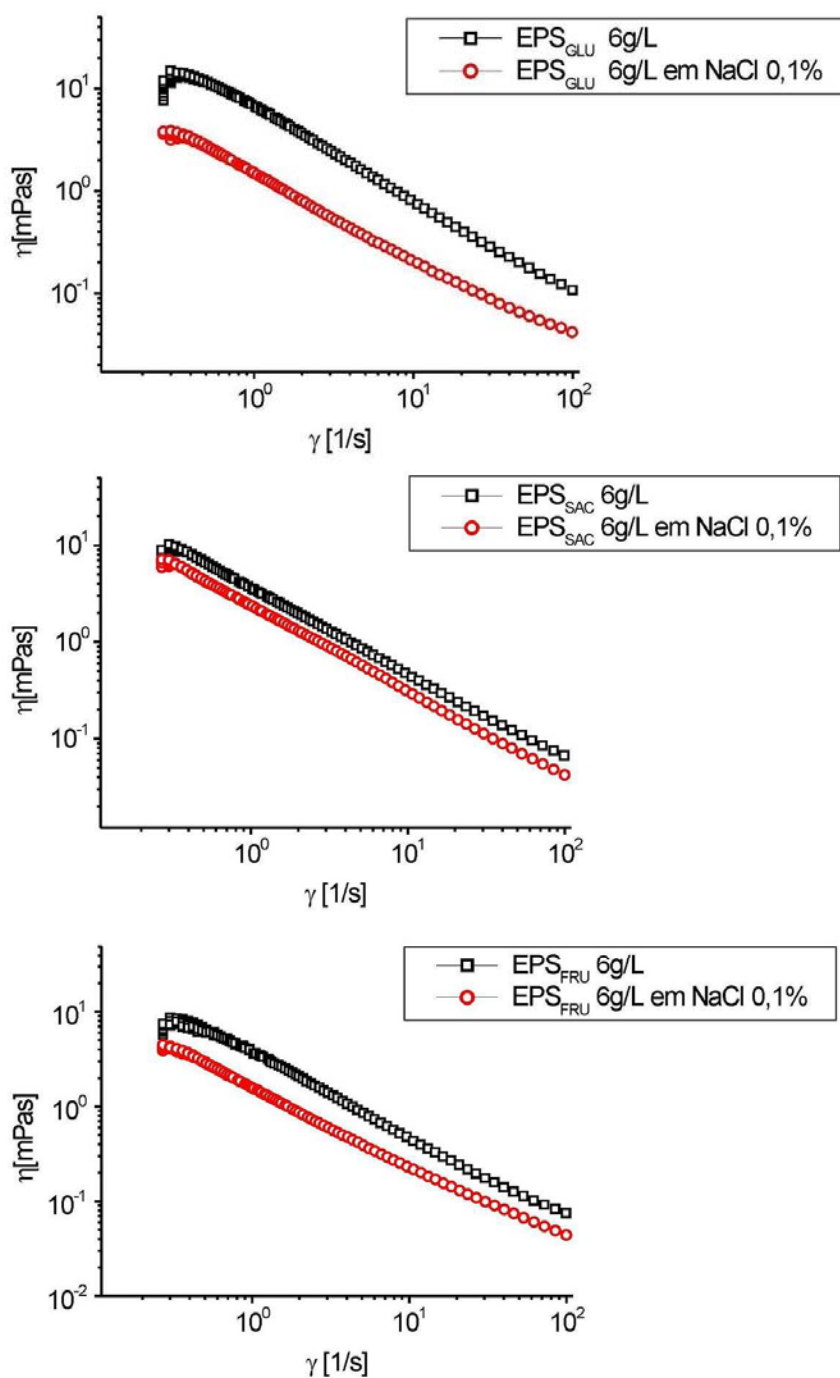


Figura 23 – Viscosidade absoluta (η) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) dos (EPS_{GLU} , EPS_{SAC} e EPS_{FRU}), 6g/L em sistema aquoso e NaCl (1g/L) à temperatura de 25°C.

Polissacarídeos com carácter de polieletrólitos são afetados pela adição de sais, como é o caso da goma xantana. Soluções de baixas concentrações de goma xantana têm a viscosidade diminuída pela adição de pequena quantidade de sais. Segundo García-Ochoa e colaboradores (2000) esse efeito pode ser atribuído à redução nas dimensões moleculares,

proveniente da diminuição das forças eletrostáticas intermoleculares, evitando a formação de grandes agregados. Entretanto, a viscosidade de suas soluções tende a aumentar em concentrações mais elevadas ou quando uma grande quantidade de sais é adicionada. Segundo Diaz e colaboradores (2004) esse efeito é devido, provavelmente, ao aumento da interação entre as moléculas de polímeros.

PINTO e colaboradores (2002) também estudaram a viscosidade do biopolímero ácido produzido pela bactéria *Beijerinckia* sp em solução de CaCO_3 e KCl , em diferentes valores de pH. Na maior parte dos resultados houve uma diminuição da viscosidade.

FARIÑA e colaboradores (2001) estudaram as propriedades reológicas da escleroglucana, um polissacarídeo neutro que possui a estrutura semelhante as β -D-glucanas produzidas pelo fungo *B. rhodina*. Os resultados indicaram uma diminuição da viscosidade nas soluções de escleroglucana 2g/L, em presença de diferentes concentrações de NaCl . Os autores não conseguiram encontrar uma explicação química para esse fenômeno, porém acreditam que a qualidade do solvente poderia ser responsável pela diminuição da viscosidade.

5.5.3 Análise em sistema dinâmico

As medidas reológicas dinâmica ou oscilatória apresentam a vantagem de permitir a utilização de amplitudes de tensão muito pequenas, minimizando os efeitos de ruptura sobre a estrutura do polímero. São realizadas em géis, que são definidos como materiais com aspecto de sólido ou quase-sólido apresentando elevadas concentrações de polímeros, de modo que os polímeros enovelem-se ao acaso e atuem como redes elásticas quando submetidos à pressão, por um pequeno intervalo de tempo. Assim, quando as medidas dinâmicas são realizadas em amplitudes de oscilação suficientemente pequenas, encontram-se dentro do limite viscoelástico linear da amostra, onde não há perturbação significativa do sistema durante a realização do experimento (SCHRAMM, 2006).

Considerando-se que os polissacarídeos atuam como materiais viscoelásticos (apresentam características de sólidos e líquidos simultaneamente) e que os módulos G' e G'' referem-se ao caráter elástico e viscoso, respectivamente, é possível quantificar a predominância do caráter sólido ou líquido de uma amostra, através das medidas dinâmicas.

Os valores de tensão para os testes de varreduras de frequência para os EPS_{GLU} e EPS_{FRU} foi de 1 Pa e para o EPS_{SAC} foi de 0,7 Pa. Nesta condição, os polímeros apresentaram comportamento viscoelásticos linear, ou seja, a tensão ou deformação aplicada não alterou a estrutura física dos EPS.

Após determinar a deformação dentro da região viscoelástica linear das amostras, foram realizadas as análises dinâmicas por varredura de frequência numa amplitude de 10^{-2} a 10 Hz. Foi observado também a influência da adição de NaCl (1g/L) sobre a força do gel à temperatura de 25°C (Figuras 24, 25 e 26).

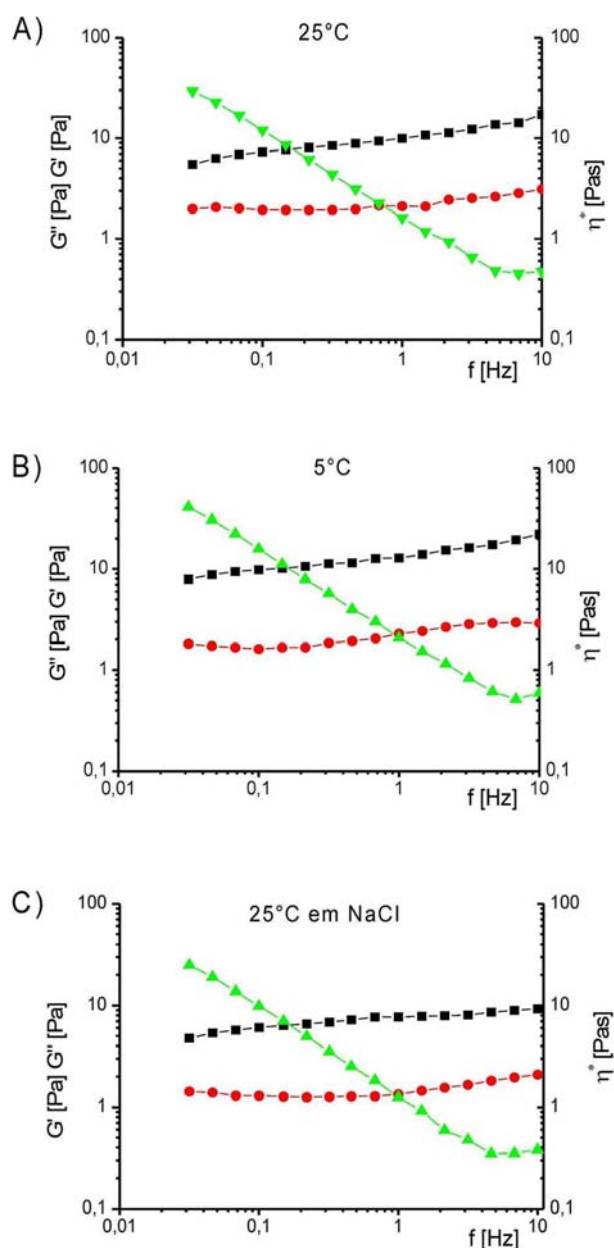


Figura 24 - Análise do comportamento viscoelástico do EPS_{GLU} em 6g/L; —■— G' módulo elástico; —●— G'' módulo viscoso; —▲— η^* viscosidade complexa. (A) em solução aquosa a 25°C; (B) em solução aquosa a 5°C; (C) em solução de NaCl (1g/L) a 25°C.

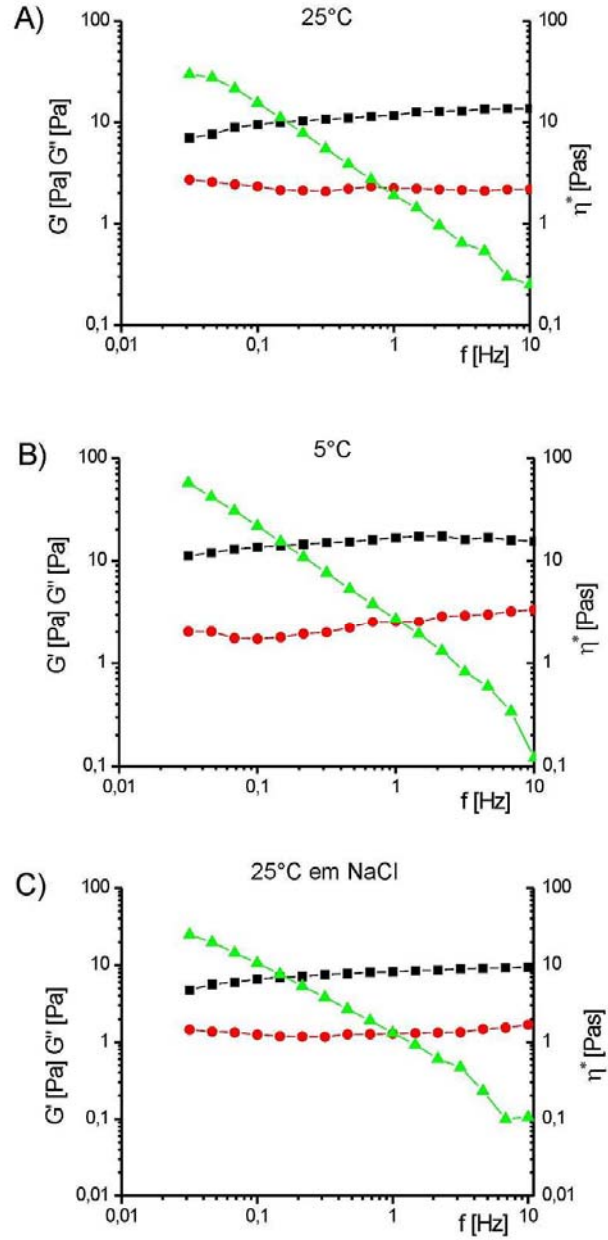


Figura 25 - Análise do comportamento viscoelástico do EPS_{SAC} em 6g/L; —■— G' módulo elástico; —●— G'' módulo viscoso; —▲— η^* viscosidade complexa. (A) em solução aquosa a 25°C; (B) em solução aquosa a 5°C; (C) em solução de NaCl (1g/L) a 25°C.

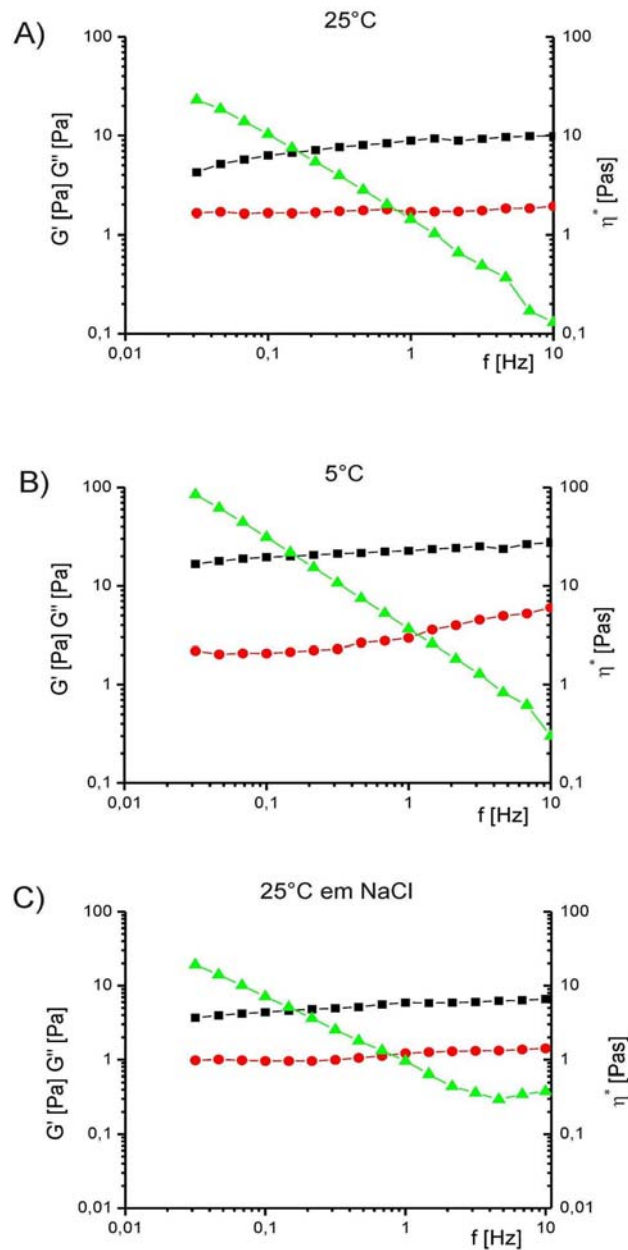


Figura 26 - Análise do comportamento viscoelástico do EPS_{FRU} em 6g/L; —■— G' módulo elástico; —●— G'' módulo viscoso; —▲— η^* viscosidade complexa. (A) em solução aquosa a 25°C; (B) em solução aquosa a 5°C; (C) em solução aquosa de NaCl (1g/L), a 25°C.

É possível observar (Figuras 24, 25 e 26) que todos os biopolímeros estudados apresentaram valores de G' superiores aos de G'' em todas as faixas de frequência analisadas. Os resultados dessas análises permitiram concluir que os polímeros EPS_{GLU}, EPS_{SAC} e EPS_{FRU} apresentam comportamento viscoelástico com caráter sólido ou seja, com características de géis fortes.

Esse comportamento já foi observado em outros polissacarídeos em solução como a goma xantana, gelana, carragenana (RODRÍGUEZ–HERNANDEZ; TECANTE, 1999), curdlana (HIRASHIMA; TAKAYA; NISHINARI, 1997), scleroglucana (MORESI et al., 2001), amido de milho e misturas de amido de milho com goma xantana e goma guar (ACHAYUTHAKAN; SUPHANTHARIKA, 2008).

François e colaboradores (2003) estudaram as características reológicas dinâmicas em matrizes de géis do exopolissacarídeo fúngico escleroglucana, para liberação da droga teofilina. Os pesquisadores observaram que diferentes concentrações do EPS e da droga influenciavam na liberação do fármaco, porém, independente da concentração utilizada para os experimentos, todos os géis possuíam características de gel forte, indicando possíveis aplicações na liberação controlada de fármaco. Mais recentemente, Viñarta e colaboradores (2007) também confirmaram a liberação controlada de teofilina em matrizes de géis do polissacarídeo escleroglucana, os mesmos mostraram caráter viscoelástico, com G' superior a G'' .

Zang e colaboradores (2007) e Xu e colaboradores (2007) observaram o comportamento de viscoelasticidade do exopolissacarídeo lentinana uma β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana extraída do corpo de frutificação do *Lentinus edodes*. Os pesquisadores concluíram que o comportamento viscoelástico dos géis de lentinana exibia forte dependência da concentração do polímero. Em baixas concentrações os géis se comportaram como gel fraco, com módulo G' inferior a G'' em baixas frequências, ocorrendo uma inversão em altas frequências. Com o aumento da concentração, o gel de lentinana se mostrou com caráter sólido, ou seja, G' superior a G'' . Esses resultados indicam que a concentração polissacarídica dos géis está fortemente ligada ao comportamento viscoelástico.

A tabela 5 mostra os valores do módulo elástico (G') obtidos na frequência de 1 Hz para os três exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina* nas temperaturas de 25° e 5°C na presença ou ausência de NaCl.

Tabela 5. Valores obtidos de (G') nas varreduras de frequências dos EPS_{GLU}, EPS_{SAC} e EPS_{FRU}, na frequência da 1 Hz.

Amostras	NaCl (1g/L)	Temperatura (°C)	G' [Pa]
EPS _{GLU}	0	5	12,8
	0	25	9,9
	1	25	7,7
EPS _{SAC}	0	5	16,8
	0	25	11,7
	1	25	8,2
EPS _{FRU}	0	5	22,7
	0	25	8,9
	1	25	5,9

A partir da análise do módulo G' na frequência de 1 Hz (Tabela 5), para os três exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *B. rhodina*, pode-se observar que o módulo elástico apresentou um aumento dos valores quando a análise foi efetuada em temperatura mais baixa, 9,9 Pa (25° C) para 12,8 Pa (5° C) para o EPS_{GLU}; 11,7 Pa (25° C) para 16,8 Pa (5° C) para o EPS_{SAC} e 8,9 Pa (25° C) para 22,7 Pa (5° C) para o EPS_{FRU}, sinalizando que a força do gel é maior em temperaturas baixas do que em temperaturas mais altas. O EPS_{SAC} apresentou-se como o gel mais forte a 25° C seguido do EPS_{GLU} e EPS_{FRU} (Figura 27-A). Esse comportamento não se manteve a temperatura de 5° C, pois de acordo com os experimentos EPS_{FRU} foi o gel mais forte (Figura 27-B).

Os três polímeros quando solubilizados em NaCl (1g/L) apresentaram uma leve diminuição do módulo elástico (G') (tabela 5), provavelmente pela diminuição das forças eletrostáticas em meio salino.

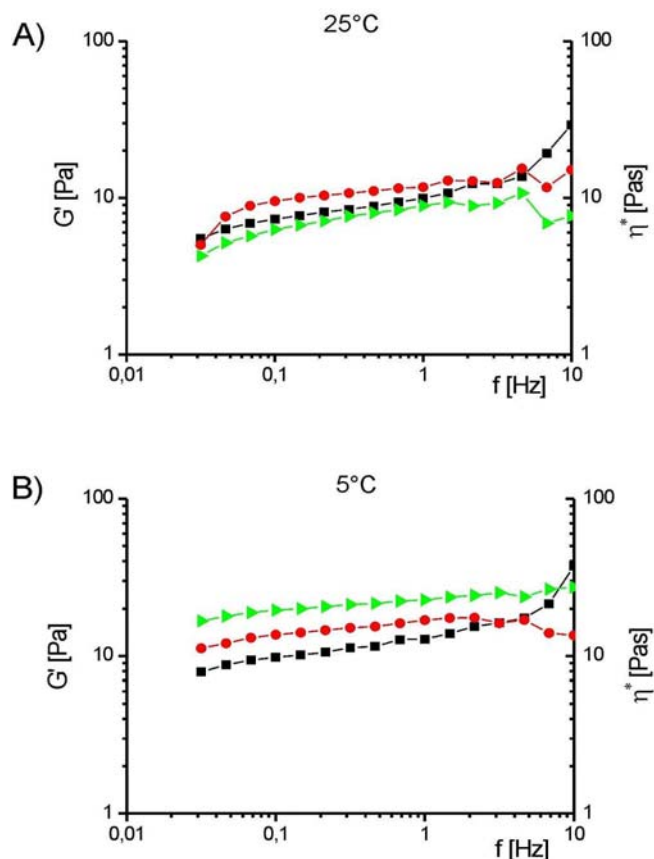


Figura 27 – Comportamento do módulo elástico (G') dos três exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *B. rhodina* MAMB-05 em glucose ($\blacksquare$ — EPS_{GLU}), sacarose ($\bullet$ — EPS_{SAC}) e frutose ($\blacktriangleright$ — EPS_{FRU}) estudados a 25°C (A) e 5°C (B).

5.5.4 Rampa de temperatura

A rampa de temperatura é um experimento que tem como objetivo estudar o comportamento viscoelástico do gel, utilizando um gradiente linear, crescente e decrescente, de temperatura. Os três géis elaborados com os exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *B. rhodina* foram analisados em uma varredura de frequência à temperatura de 5 a 95°C (ascendente) e de 95 a 5°C (descendente), com um aumento de 1,5°C/min.

Os resultados encontrados (Figura 28) permitiram concluir que todos os três polissacarídeos formam soluções de géis fortes, pois os valores de G' se mostraram superiores aos de G'' em todas as faixas de temperatura, independente de ser a rampa ascendente ou descendentes.

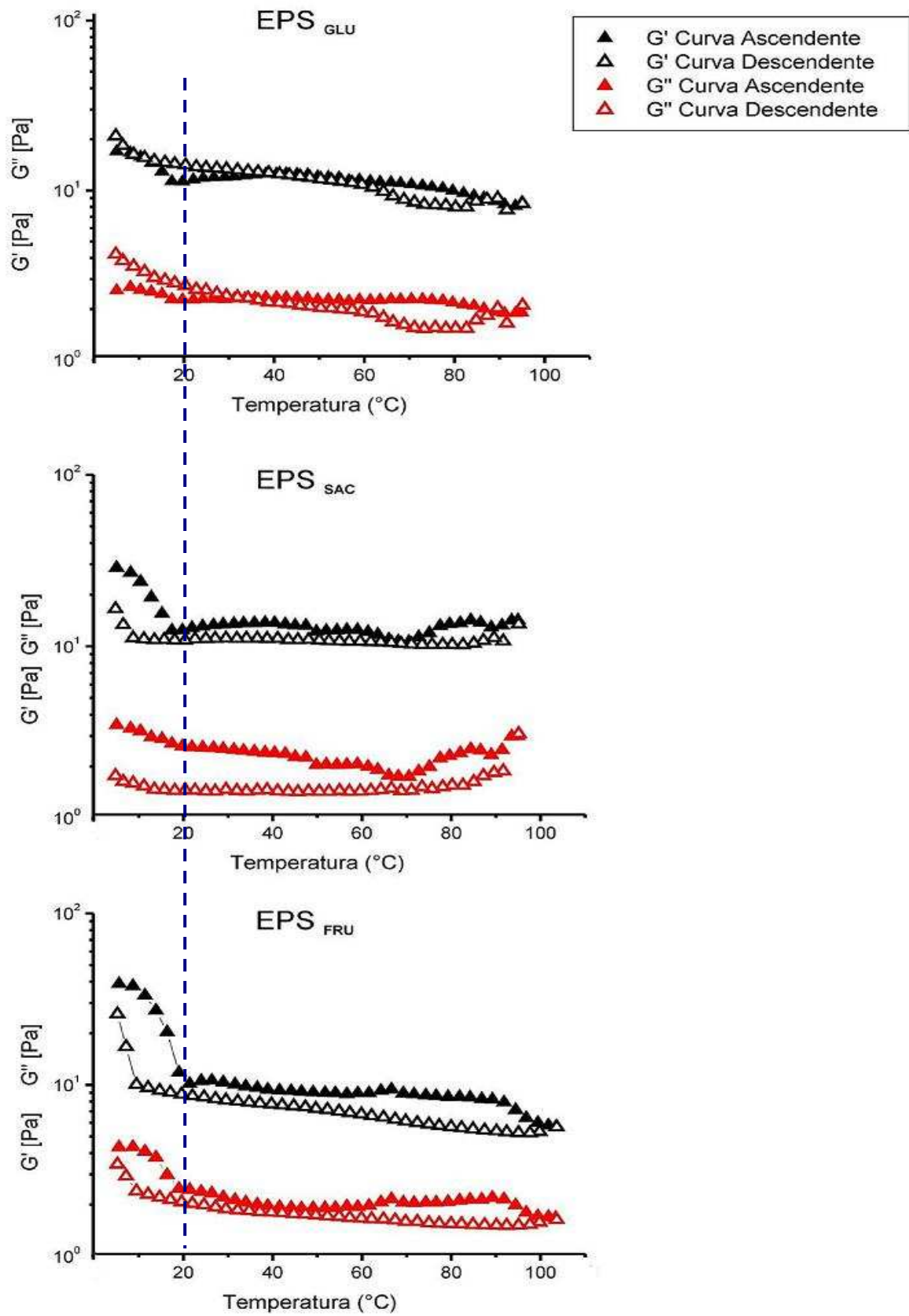


Figura 28 – Rampa de temperatura. Curva ascendente (5 a 95°C) e descendente (95 a 5°C), com aumento de 1,5°C/min., em solução aquosa (6g/L).

Dentro da faixa de temperatura analisada (5 a 95°C) o EPS_{FRU} mostrou aumento significativo nos valores de G' nas temperaturas inferiores a 20°C (linha azul). Uma dependência menos pronunciada foi observada para os EPS_{SAC} e EPS_{GLU}. Acima de 20°C houve uma estabilização dos valores de G' e G'' para EPS_{SAC}, podendo-se sugerir um comportamento termo-estável na faixa de 20 a 95°C. No entanto para EPS_{GLU} e EPS_{FRU} vemos um pequeno decréscimo nos valores de G' e G'' faixa de 20 a 95°C. O mesmo comportamento foi observado na rampa descendente (95 a 5°C), caracterizando-os como géis termo resistentes. Este comportamento pode estar relacionado com as diferenças estruturais das amostras de EPS e as conformações adotadas nas diferentes temperaturas.

5.5.5 Tixotropia

A tixotropia é um fenômeno reológico característico de substâncias cuja viscosidade depende do tempo de cisalhamento. Ela descreve o comportamento de substâncias que passam do estado gel de alta viscosidade para o estado de solução com viscosidade muito baixa, como resultado de um alto cisalhamento por um período de tempo relativamente longo (SCHRAMM, 2006, p.215). Um importante critério da tixotropia é o processo reversível de reespessamento da substância, quando deixada em repouso.

Testes reológicos em que a amostra é submetida ao aumento da taxa de cisalhamento seguido pela diminuição da taxa servem para observar a tixotropia do material, cuja ocorrência é verificada quando a curva de aumento da taxa não coincide com a curva de decréscimo da taxa no gráfico de $\tau \times \dot{\gamma}$. O diagrama resultante é denominado de curva de histerese (ARAÚJO, 2007).

A curva de histerese (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) dos três polissacarídeos estudados mostrou que todos apresentam comportamento tixotrópico (Figura 29).

Mao e colaboradores (2007) estudaram o comportamento tixotrópico do grifolana, uma β -(1,3)-D-glucana, realizando análises reológicas em sistema estacionário e a conformação em tripla hélice pela formação do complexo entre o polímero e o corante Congo Red. Considerando esses dois resultados os pesquisadores inferiram que o comportamento tixotrópico do gel de grifolana poderia se atribuído à ruptura de agregados da tripla hélice, sob cisalhamento. Considerando-se que os EPS_{GLU}, EPS_{SAC} e EPS_{FRU} também apresentaram

conformação em tripla hélice, nos experimentos com o Congo Red (Figura 15, pg. 64), a desagregação de suas cadeias, sob alto cisalhamento, poderia ser a causa do comportamento tixotrópico desses polissacarídeos.

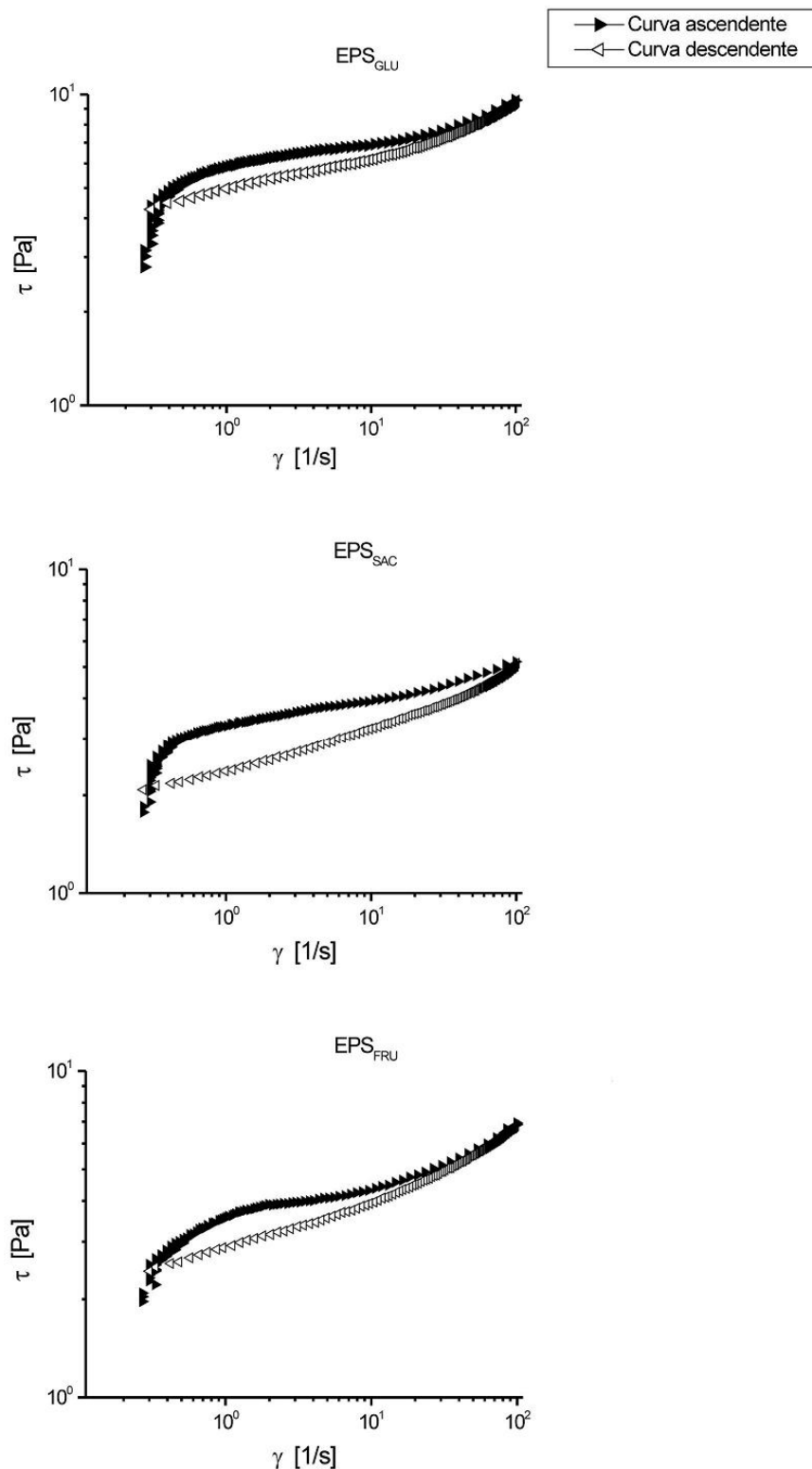


Figura 29 – Tensão de cisalhamento (τ) versus a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) dos três exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *B. rhodina*, nas concentrações de 6g/L a 25°C.

Grassi e colaboradores (1996) observaram o fenômeno da tixotropia no escleroglucana, um polissacarídeo natural produzido extracelularmente pelos fungos do gênero *Sclerotium*. Posteriormente, Fariña e colaboradores (2001) verificaram a conformação do escleroglucana em tripla hélice utilizando experimento de complexação com o corante Congo Red. Esta molécula é, hoje, o polímero de origem fúngica com maior aplicação e comercialização industrial, principalmente nas áreas farmacêutica e alimentícia.

Os produtos tixotrópicos possuem algumas vantagens tecnológicas, pois tendem a apresentar maior vida de prateleira (“shelf-life”) durante o armazenamento, mantendo a viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (CORRÊA et al., 2005).

A obtenção de formulações de uso tópico com caráter tixotrópico é bastante almejada, pois elas se deformam durante a aplicação tornando-se mais fluídas e, conseqüentemente, facilitando o espalhamento e recuperam a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, evitando que o produto escorra (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2003).

Podemos observar que os materiais tixotrópicos possuem inúmeras aplicações tecnológicas, portanto o comportamento tixotrópico apresentado pelos exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *B. rhodina*, nos faz inferir que esse material possui características reológicas que permitem sua utilização em diversos setores industriais. O emprego industrial destes exopolissacarídeos se torna apenas uma questão de tempo, uma vez que inúmeras linhas de pesquisas vêm se abrindo, e atualmente os EPS vêm despertando o interesse da indústria.

Segue em anexo o artigo submetido à revista Revista Brazilian Journal of Food Technology.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os dados relatados neste trabalho, observou-se que a metodologia adotada para produção de $\beta(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ D-glucanas pelo fungo *B. rhodina* MAMB-05, em três diferentes fontes de carbono, foi eficiente para obtenção de exopolissacarídeos, homogêneos, de acordo com a cromatografia de filtração em gel à pressão normal.

A análise da conformação pela complexação dos EPS com o Congo Red indicou a presença de tripla hélice nas β -glucanas produzida pelo fungo *B. rhodina*, provavelmente, responsável pela viscosidade das soluções polissacarídicas.

Conforme as curvas de fluxo e de viscosidades os biopolímeros em solução apresentaram comportamento não-Newtoniano, com características de soluções pseudoplásticas e tixotrópicas.

Os resultados das análises dinâmicas confirmaram a formação de um gel forte em 5 e 25°C, não sofrendo mudanças no comportamento, mesmo em presença de 0,1% NaCl, à temperatura de 25°C. Ao analisar a influência de uma ampla faixa de temperatura (5 a 95°C) sobre o comportamento viscoelástico dos géis, observou-se que as soluções apresentaram características de gel forte, com propriedades termo-estável e termo-reversível.

Os resultados encontrados neste trabalho nos permitem concluir que os EPS produzidos pelo fungo *B. rhodina* possuem propriedades químicas e físicas, com potencial para utilização nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e biomédica.

Trata-se de um trabalho inédito, pois pela primeira vez estudos reológicos foram realizados nos exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina* MAMB-05.

7. REFERÊNCIAS

- ACHAYUTHAKAN, P.; SUPHANTHARIKA, M. Pasting and rheological properties of waxy corn starch as affected by guar gum and xanthan gum. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 71, p. 9–17, 2008.
- ÁLVAREZ, E. E.; SÁNCHEZ, P. G. La fibra dietética. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 21, p. 61-72, 2006.
- ARAÚJO, D. G. NASCIMENTO, C. R. Propriedades Reológicas da Polpa de Bauxita – II. Avaliação do rotor tipo *vane*. **XV Jornada de Iniciação Científica – CETEM**, 2007, Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XV_jic_2007/Diego.pdf> Acesso em: 18 Dez.2007.
- ARAUJO, L.; ALVES, F.; Aditivos e ingredientes: ao gosto do consumidor. **Brasil Alimentos**, São Paulo, nº 19, p. 18-24, 2003.
- ARVIDSON, S. A.; RINEHART, B. T.; GADALA-MARIA, F. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *bacillus sp.* **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.65, p.144–149, 2006.
- BAE, I Y. IM-KYUNG, O.; LEE, S.; YOO S. H.; LEE, H. G. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 42, p.10-13, 2008.
- BANIK, R. M. , KANARI, B.; UPADHYAY, S. N. Review: Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Kanganam-Ku, v.16, p. 407-414, 2000.
- BARBER, P. A.; BURGESS, T. J.; HARDY, G. E. S. J.; SLIPPERS, B., KEANE, P. J.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeria species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture. **Mycological Research**, Oxford, v.109, p.1347–1363, 2005.
- BARBOSA, A.M.; CUNHA, P.D.T.; PIGATTO, M.M.; CORRADI DA SILVA, M.L. Produção e aplicação de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnologia**, Londrina, v.25, p.29-42, 2004.
- BARBOSA, A.M. ; DEKKER, R.F.H. ; HARDY, G. E. S. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete *Botryosphaeria sp.*, when screened on the polymeric dye poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.23, p.93-96, 1996.
- BARBOSA, A.M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; DA SILVA, M.L.C. Structural characterization of *Botryosphaeran* : a (1→3,1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria sp.* **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.338, p.1691-1698, 2003.
- BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; KURTBOKE, I.; ST. HARDY, G. E. *In vivo* decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in

bioremediation. **Proc. 4th Pacific Rim Biotechnology Conference**, Melbourne, Austrália, p.88-90, 1995.

BARNES, A., HUTTON, J.F., WALTERS, K., **An introduction to Rheology**. Netherlands, Elsevier, p.199, 1989.

BARONI, A. F.; FREITAS, I. C. Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: viscosidade extensional e em cisalhamento. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, p.21-29, 1999.

BERWANGER, A. L. S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F. F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. **Ciência Agrotecnica**, v. 31, p. 177-183, 2007.

BERWANGER, A. L. S. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por shingomonas capsulata**. 2005. 94f. Dissertação (Mestrado) Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional integrada do Alto Uruguai e das missões – URI, Campus de Erechim.

BOYER, R.F. **Modern Experimental Biochemistry**. 2º. Califórnia: Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1993, p. 59-114.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v.72, p.248-254, 1976.

BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2º ed., EdUFSCar, São Carlos, 2005.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R.C.; FRANCA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v.27, p.245–247, 2000.

CAMPOS, S. D. S.; GONÇALVES, J. R.; MORI, E. E. M.; GASPARETTO, C. A. Curso: Reologia e textura de alimentos. **Apostila Instituto de Tecnologia de Alimentos ITAL**, p. 1-17, Campinas, 1989.

CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 20, p. 32-41, 2006.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O.; DEMIATE, I. M. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. v. 3, Ed. Fundação Cargil, São Paulo, 2003.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. **Mycological Research**, Oxford, v.3, p.635 – 652, 2007.

CHENGHUA, D.; XIANGLIANG, Y.; XIAOMAN, G. YAN, W.; JINGYAN, Z.; HUIBI, X. A β -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 328, p. 629–633, 2000.

CHO, E. J.; OH, J. Y.; CHANG, H. Y.; YUN, J. W. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.127, p. 129–140, 2006.

COELHO, M. C. O. C.; CARRAZONI, P. G.; MONTEIRO, V. L. C.; MELO, F. A. D.; MOTA, R. A.; FILHO, F. T. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta. Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, p. 11-13, 2002.

COLINET, I.; PICTON, L.; MULLER, G.; CERF, D. L. pH-dependent stability of scleroglucan borate gels. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 69, p. 65–71, 2007.

COLTRO, A.L. **Produção e Determinação da Composição dos Exopolissacarídeos Produzidos por Bactérias Isoladas da Rizosfera**. 2003.118f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de São José do Rio Preto.

CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Nova Química**, São Paulo, v.29, p. 85-92, 2006.

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→3;1→6)-β-glucan from *Botryosphaeria* sp. produced in two different carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.61, p. 10-17, 2005.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, p. 73-78, 2005.

COSTA, M. Entenda o que é tixotropia. **Informativo CRQ-IV**, nº. 81 p. 10-11, 2006.

COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F.; DORIGO, A.; MATRICARDI, P.; GRASSI, M. Two galactomannans and scleroglucan as matrices for drug delivery: Preparation and release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 66, p. 200–209, 2007.

CRUZ PRADELLA, J. G. Biopolímeros e Intermediários Químicos. **Relatório Técnico nº 84 396-205**, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos - Laboratório de Biotecnologia Industrial-LBI/CTPP, 2006. Disponível em <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf>, acesso em 23/11/2007.

CUNHA, M. A. A.; GÓMEZ, R. J. H. C.; AMORIM, E. S. Goma curdlana: um importante hidrocolóide microbiano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 379-384, 2003.

CUNHA, M. A. A.; SANTOS, J. C.; GÓMEZ, R. J. H. C.; SILVA, S. S. Goma curdlana: Propriedades e aplicações. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 55-61. 2004.

DEKKER R. F. H.; VASCONCELOS A. F. D.; BARBOSA A. M.; GIESE E. C.; PACCOLA-MEIRELLES L. A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-

degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.; influence of carbon source. **Biotechnology Letters**, New York, v. 23, p.1987-1993, 2001.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Veratryl alcohol as inducer of laccase by ascomycete *Botryosphaeria* sp., when screened on polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 23, p. 93-96, 1996.

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**, New York, v. 28, p. 81-88, 2001.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, p. 15-28, 2004.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, p. 25-39, 2003.

DONG, Q.; JIA, L. M.; FANG, J. N. A. β -D-glucan isolated from the fruiting bodies of *hericium erinaceus* and its aqueous conformation. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 341, p. 791-795, 2006.

DOUBLIER, J. L.; CASTELAIN, C.; LEFEBVRE, J. **Viscoelastic properties of mixed polysaccharides systems**. In: MEUSER, F.; MANNERS, D.J.; SEIBEL, W. (Ed.) Plant Polymeric Carbohydrates. Cambridge: the Royal Society of Chemistry, 1993. p. 76-85

DUBOIS, N.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry** Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, p. 71-82, 2005.

FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L.; STOKKE, B. T. The cytokine stimulating activity of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans is dependent of the triple helix conformation. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 329, p. 587-596, 2000.

FARIA-TISCHER, P. C. S. **Estrutura química, propriedades reológicas e atividade antiviral das galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae* (gigartinales)**. 2006, 197f. Dissertação (Doutorado), Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FARIÑA, J. I.; SIÑERIZ, F.; MOLINA, O. E.; PEROTTI, N. I. Isolation and physicochemical characterization of soluble scleroglucan from *Sclerotium rolfii*. Rheological properties, molecular weight and conformational characteristics. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 44, p. 41-50, 2001.

FRANÇOIS, N. J.; ROJAS, A. M.; DARAIO, M. E. Rheological and drug-release behaviour of a scleroglucan gel matrix at different drug loadings. **Polymer International**, v. 54, p. 1613–1619, 2005.

FRANÇOIS, N. J.; ROJAS, A. M.; DARAIO, M. E.; BERNIK, D. L. Dynamic rheological measurements and drug release kinetics in swollen scleroglucan matrices. **Journal of Controlled Release**, Boston, v. 90, p. 355–362, 2003.

FREITAS, C. A. S.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; RODRIGUES, M. C. P.; SOUSA, P. H. M. Estabilidade do suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* d.c.) adoçado envasado pelos processos *hot-fill* e asséptico. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 544-549, 2006.

FUNAMI, T.; FUNAMI, M.; YADA, H.; NAKAO, Y. Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 13, p. 317–324, 1999.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties, **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 18, p. 549-579, 2000.

GARRIDO, L. R.; SONEGO, O. R.; GOMES, V. N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 322-324, 2004.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 250, p. 35-44, 2003.

GIL, E. C.; COLARTE, A. I.; GHZAOUI, A. E.; DURAND, D.; DELARBRE, J. L.; BATAILLE, B. A sugar cane native dextran as an innovative functional excipient for the development of pharmaceutical tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Shannon, v. 68, p. 319-329, 2008.

GÓMEZ, M.; RONDA, F.; CABALLERO, P. A.; BLANCO, C. A.; ROSELL, C. M. Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, p. 167–173, 2007.

GRASSI, M.; LAPASIN, R.; PRIC, S. A study of the rheological behavior weak gel systems of scleroglucan. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 29; p.169-181; 1996.

HAMINIUK, C. W. I. **Estudo do comportamento reológico e colorimétrico de misturas ternárias e sistemas pécticos de polpas de morango, amora-preta e framboesa**. 2007. 124f. Dissertação (Doutorado). Programa de pós-graduação em tecnologia de alimentos, setor de tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

HIGIRO, J.; HERALD, T. J.; ALAVI, S. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution. **Food Research International**, Toronto, v. 39, p.165–175, 2006.

HIRASHIMA, M.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. DSC and rheological studies on aqueous dispersions of curdlan. **Thermochimica Acta**, Salamanca, v. 306, p. 109-114, 1997.

HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Estudo da massa molar viscosimétrica de dextrana obtida via processo fermentativo com dextrana-sacarase do *leuconostoc mesenteroides* B512F. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Anais, p.1-6, 2005.

IAGHER, F. **Análise estrutural e estudo das propriedades reológicas de polissacarídeos extraídos de polpa de manga (*Mangífera indica* L.)**. 2000. Dissertação (mestrado), Pós graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal Bioscience**, Karnataka, v. 27, p.703-714, 2002.

KIMURA, I. A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M. S.; DIAS, N. A.; MICHELATO, S. R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, n.1, p. 21-24, 2003.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. B.; KONTOGIORGOS, V. Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 52, p. 151–166, 2003.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C.G. Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects, **Journal of Cereal Science** (2007), doi:10.1016/j.jcs.2007.05.003.

LIN, T. Y.; CHANG, M. F. C. Expolysaccharides productin as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, Whiteknights, v. 100, p. 1419-1423, 2005.

LIN, Y.; ZHANG, Z.; THIBAUT, J. *Aureobasidium pullulans* batch cultivations based on a factorial design for improving the production and molecular weight of exopolysaccharides. **Process Biochemistry**, London, v. 42, p. 820-827, 2007.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 12, p. 65-6,1991.

LÓPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 63, p. 111–115, 2004.

LUNARDI, R.; SEIBERT, E.; PEZZI, E.; BENDER, R. J. Tratamento por água quente na qualidade de maçãs ‘fuji’, inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria Dothidea*, em armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 565-570, 2002.

MAIA, L. H.; PORTE, A.; SOUZA, V. F. Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira a umidade e oxigênio. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, p. 105-128, 2000.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2º edição, Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1999.

MAO, C. F.; HSU, M.; HWANG, W. Physicochemical characterization of grifolan: Thixotropic properties and complex formation with Congo Red. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 68, p. 502–510, 2007.

MARCOTTE, M.; HOSHAHILI, A. R. T.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, Toronto, v. 34, p. 695–703, 2001.

MALKIN, Y. A. **Rheology Fundamentals**. Toronto: ChemTec, 1994.

MATRICARDI, P.; ONORATI, I.; COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F. Drug delivery matrices based on scleroglucan/alginate/borax gels. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 316, p. 21–28, 2006.

MIRANDA, C. C. B. O. **Produção de Botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênicas, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica**. 2006.185f. Dissertação (Mestrado). Departamento de bioquímica e Biotecnologia – Programa de mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina-PR.

MONTEIRO, C. S.; CARPES, S. T.; KALLUF, V. H.; DYMINSKI, D. S.; CÂNDIDO, L. M. B. Evolução dos substitutos de gordura utilizados na tecnologia de alimentos. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, p. 347-362, 2006.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, Omaha, v. 7, p. 701–724, 2007.

MOREIRA, A. N.; MOREIRA A. S.; DIA, S. P.; VENDRUSCOLO, C. T. Comportamento reológico e composição química do biopolímero da bactéria *Beijerinckia sp.* 7070 produzido por via enzimática. **Brazil Journal Food Technology**, Campinas, v.8, p. 135-142, 2005.

MORESI, M.; PRESTI, S. L.; MANCINI, M. Rheology of scleroglucan dispersions. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 50, p. 235-245, 2001.

MORESI, M.; BRUNO, M.; CROGNALE, S.; PETRUCCIOLI, M. Rheological behaviour of β -glucan from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in aqueous dispersions. **3rd International Symposium on Food Rheology and Structure**. p. 483-484, 2003.

MORRIS, E. R. Polysaccharide Rheology and In- mouth perception. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, p.517-546, 1995.

NAESSENS, M.; CERDOBBEL, A.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. Review: *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Hoboken, v. 80, p. 845–860, 2005.

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. 1º ed, Editora da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 1997.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: principles of biochemistry**; 3 ed, Worth Publishers, New York, 2000.

NELSON, N.A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**, Amsterdam, v. 153, p. 376-380, 1944.

OGAWA, K.; WATANABE, T.; TSURUGI, J.; ONO, S. Conformational behaviour of a gel-forming (1→3)- β -D-Glucan in alkaline solutions. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 23, p. 399-405, 1972.

PALLESCHI, A.; BOCCHINFUSO, G.; COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F. Molecular dynamics investigations of the polysaccharide scleroglucan: first study on the triple helix structure. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, p. 2154–2162, 2005.

PALLESCHI, A.; COVIELLO, T.; BOCCHINFUSO, G.; ALHAIQUE, F. Investigation on a new scleroglucan/borax hydrogel: Structure and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 322, p. 13–21, 2006.

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, 1994, p. 181-229.

PIÑERO, M. P.; FERRER, M. A.; MORENO, L. A.; HUERTA- LEIDENZ, N.; KATYNNA C. PARRA, K. C.; BARBOZA , Y. Evaluation of physical properties of “Low-Fat” meat for hamburger beef formulated with β -Glucan. **Revista Científica**, Maracibo, v. 14, p. 500-505, 2004.

PINTO, E. P.; MOREIRA, A.; VENDRUSCOLO, C. T. Influência do pH, adição de sais e temperatura na viscosidade dos biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 e UR4. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 8, p. 247-251, 2002.

RAO, V. S. R.; QASBA, P. K. BALAJI, P.U.; CHANDRASEKARAN, R. **Conformation of Carbohydrates**. 1^o ed., Harwood Academic Publishers. 1998.

RAMESH, H. P.; THARANATHAN, R. N. Structural characteristics of a mixed linkage β -d-glucan from sorghum (*Sorghum bicolor*). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 308, p. 239-243, 1998.

RINAUDO, M., MILAS, M., BRESOLIN, T. AND GANTER, J. Physical properties of xanthan galactomannan and their mixtures in aqueous solutions. **Macromolecular Chemistry and Physics Macromolecules Symposia**. v. 140, p. 115–124, 1999.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I.; TECANTE, A. Dynamic viscoelastic behavior of gellan-carrageenan and gellan-xanthan gels. **Food Hydrocolloid**. Oxford, v. 13, p. 59-64, 1999.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de Xanthomonas sp. Para produção de goma xantana**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado) Departamento de ciências agrárias – Programa de mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguia e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ISLAM, S. S. The structure and conformation of a water insoluble (1→3)-, (1→6)-β-D-glucan from the fruiting bodies of *Pleurotus florida*, **Carbohydrate Research** Amsterdam, (2008), doi: 10.1016/j.carres.2007.12.022

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 42, p. 1-16, 2006.

SANTOS, M.; RODRIGUES, A.; TEIXEIRA, J. A. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.25, p.1-6, 2005.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. tradução e adaptação: MOTHE, C. G.; CORREIA, D. Z.; PETRI, H. M.; GONÇALVES, M.; CARESTIATO, T., Artliber, São Paulo 2006.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Brazil Journal Food Technology**, Campinas, v.2, p. 7-19, 1999.

SHAW, D.J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo. Ed. Edgard Blucher Ltda. 1975, 184 p.

SHIN, H. T.; BAIG, S. Y.; LEE, S. W.; SUH, D. S.; KWON, S. T.; LIM, Y. B.; LEE, J. H. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 93, p. 59-62, 2004.

SILVA, F. C.; GUIMARÃES, D. H. P.; GASPARETTO, C. A. Reologia do suco de acerola: efeitos da concentração e temperatura. **Ciências Tecnologia Alimentos**. Campinas, v. 25, p. 121-126, Campinas, 2005.

SLIPPERS, B.; FOURIE, G.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; CARNegie, A. J.; WINGFIELD, M. J. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p. 343-358, 2004.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, p. 331-340, 2004.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. Freeman Press, Michigan: 1996. 2nd. ed.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGATO, 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. Comparation of *Botryosphaeria* production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 44, p. 480-486, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 11, p. 663-674, 2001.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**, v. 16, p. 41-46, 1998.

TABILO-MUNIZAGA, G; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 67, p. 147-156, 2005.

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**. 2006. Dissertação (doutorado). Departamento de Química - Programa de doutorado em Engenharia Química. Universidade de Aveiro, Portugal. Disponível em: <<http://path.web.ua.pt/file/Ana%20tavares%20tese.pdf>>, acesso em 24/07/2007.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da Reologia de Polissacarídeos Utilizados na Indústria de Alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 7, p. 181-204, 2005.

TORALLES, R. P.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T. Reologia de Purê Homogeneizado de Pêssego: Efeito da Temperatura e concentração. **Brazil Journal Food Technology**, Campinas, v.9, p. 1-8, 2006.

TORRES, M. A.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Viscous and viscoelastic properties of chitosan solutions and gels. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.9, p. 101-108, 2006.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; LEAVITT, G. M.; VOEGEL, T. M.; GUBLER, W. D. Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with grapevine cankers in california. **Plant Disease**, v. 90, p. 1490-1503, 2006.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V.; AMORIM, L.; PORTO, M. D. M. Detecção e epidemiologia da podridão branca da maçã. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 30, p. 217-223, 2005.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. Principais doenças do maracujazeiro na região nordeste e seu controle. **Comunicado técnico 86, EMBRAPA**, p.1-11, 2003, disponível em : <http://www.cnpat.embrapa.br/publica/pub/ComTec/cot_86.pdf>, acesso em 20/07/2007.

VIÑARTA, S. C.; MOLINA, O. E.; FIGUEROA, L. I. C.; FARIÑA, J. I. A further insight into the practical applications of exopolysaccharides from *Sclerotium rolfsii*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.20, p.619-629, 2006.

VIÑARTA, S. C.; FRANÇOIS, N. J.; DARAIO, M. E.; FIGUEROA, L. I. C.; JULIA I. FARIÑA, J. I. *Sclerotium rolfsii* scleroglucan: The promising behavior of a natural polysaccharide as a drug delivery vehicle, suspension stabilizer and emulsifier. **International Journal of Biological Macromolecules**.Oxford, (2007), doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.04.001.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-47, 1956.

WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, Oxford, v. 272, p. 1-40, 1993.

XU, X.; XU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, L. Rheology of triple helical Lentinan in solution: Steady shear viscosity and dynamic oscillatory behavior. **Food Hydrocolloids**. Oxford, (2007), doi:10.1016/j.foodhyd.2007.02.010.

YAMAMOTO, F.; CUNHA, R. L. Acid gelation of gellan: Effect of final pH and heat treatment conditions. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 68, p. 517–527, 2007.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **Journal Nutritional Biochemistry**, Lexington, v. 10, p. 13-18, 1999.

YOO, S.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H. G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 34, p. 37–41, 2004.

YOON, E. J.; YOO, S.; CHA, J.; LEE, H. G. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 34, p. 191–194, 2004.

ZHANG, L.; LI, X.; XU, X.; ZENG, F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, p. 1515–1521, 2005 B.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, p. 4-19, 2007.

ZHANG, W.; YANG, J.; SHI, P.; CHEN, J.; HAN, X.; WANG, Y. Effects of exopolysaccharide fraction (EPSF) from a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus on c-Myc, c-Fos, and VEGF expression in B16 melanoma-bearing mice. **Pathology – Research and Practice**, Magdeburg, v. 201 p. 745–750, 2005 A.

ZHANG, Y.; XU, X.; ZHANG, L. Dynamic viscoelastic behavior of triple helical Lentinan in water: Effect of temperature. **Carbohydrate Polymers** (2008), doi:10.1016/j.carbpol.2007.10.020.

ANEXO

Artigo encaminhado a Revista Brazilian Journal of Food Technology.

CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DOS BOTRIOSFERANAS PRODUZIDOS PELO *BOTRYOSPHERA*
RHODINA MAMB-05 EM GLUCOSE, SACAROSE E FRUTOSE COMO FONTES DE CARBONO.

RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BOTRYOSPHERANS PRODUCED BY *BOTRYOSPHERA*
RHODINA MAMB-05 IN GLUCOSE, SUCROSE AND FRUCTOSE AS CARBON SOURCE

Raphael Alves Macedo Bongiovani^a, Joana Lea Meira Silveira^b, Ana Lúcia Barretto Penna^a, Robert Frans Huibert Dekker^c, Aneli de Melo Barbosa^d, Maria de Lourdes Corradi da Silva^e  .

^aDept^o de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos – IBILCE - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

^bDept^o de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

^cUniversidad de Castilla-La Mancha, Instituto de Regional Investigación Científica Aplicada (IRICA), Ciudad Real, Spain.

^dDept^o de Bioquímica e Biotecnologia - CCE, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

 ^eDept^o de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal 467, CEP 19060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. E-mail: corradi@fct.unesp.br

RESUMO

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 secreta no meio líquido de cultivo um exopolissacarídeo (EPS), botriosferana, caracterizado como uma $\beta(1\rightarrow3; 1\rightarrow6)$ -D-glucana, com aproximadamente 22% de ramificações em C-6, constituídas por unidades glucosídicos e gentiobiosídicos $\beta 1\rightarrow6$ ligados à cadeia principal. A comparação da produção do botriosferana em três diferentes fontes de carbono mostrou maior rendimento em sacarose, seguido de glucose e frutose. A diferença na estrutura química desses EPSs foi relacionada ao grau de ramificação. As soluções aquosas dessa família de biopolímeros apresentaram diferentes viscosidades e conseqüentemente algumas de suas características reológicas foram examinadas. As análises reológicas dos polissacarídeos apresentaram comportamento não-Newtoniano, com características de soluções pseudoplásticas. O comportamento tixotrópico, confirmado pela curvas de histerese, foi apresentado pelas soluções dos polissacarídeos obtidos nas três diferentes fontes de carbono. Os resultados obtidos sugerem que esta família de botriosferanas, produzida pelo fungo *B. rhodina* MAMB-05, tem propriedades físico-químicas adequadas para uso e aplicações comerciais.

Palavras-chaves: Comportamento reológico; Botriosferana; Caráter Pseudoplástica; Comportamento tixotrópico.

SUMMARY

The ascomyceteous fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 secretes into the liquid culture medium an exopolysaccharide (EPS), botryosphaeran, characterized as a $\beta(1\rightarrow3; 1\rightarrow6)$ -D-glucan with approximately 22 % side-branching at C-6 constituted by glucose and gentiobiose units, which are $\beta 1\rightarrow6$ -linked to the backbone chain. The comparison of botryosphaeran produced by growing the fungal

isolate on three different carbon sources showed higher yields on sucrose followed by glucose and fructose. The difference in chemical structure of these EPS's was related to the degree of branching. The aqueous solutions of this family of biopolymers presented different viscosities, and consequently some rheological properties were examined. The analyses rheological of polysaccharides presented a Non-Newtonian behaviour with characteristics of the pseudoplastic solutions. The thixotropic behaviour was confirmed by hysteresis curves of the polysaccharide solutions obtained with the three different carbon sources. The findings give support that this family of botryosphaerans produced by the fungus *B. rhodina* MAMB-05 have physicochemical properties suitable for use in commercial applications.

Key Words: Rheological behaviour; Botryosphaeran; Character Pseudoplastic; Thixotropic behaviour.

1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros extracelulares produzidos por algumas bactérias e fungos e, alguns, são capazes de formar soluções viscosas, mesmo em baixas concentrações. Esses biopolímeros vêm substituindo progressivamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais, como plantas e animais, devido à facilidade de obtenção e possibilidade de aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e têxtil (METHACANON et al., 2005; SUTHERLAND, 1998). Dentre os inúmeros biopolímeros, os de origem bacteriana como a goma xantana e gelana são os que possuem as maiores aplicações e já são produzidas em escala industrial (COVIELLO et al., 2007; ZHANG et al., 2007).

Polissacarídeos de origem fúngica como lentinana, escleroglucana e esquizofilana são aplicados como aditivos em diferentes indústrias, em particular alimentícia e farmacêutica por, principalmente, não apresentarem toxicidade (ZHANG et al., 2007).

O botriosferana, um exopolissacarídeo produzido pelo fungo ascomiceto *Botryospharia rhodina* MAMB-05, quando cultivado em glucose como fonte de carbono, é formado por uma cadeia principal de unidades glucosídicas em ligação do tipo β -(1,3), com aproximadamente 22% de ramificação em C-6 por resíduos glucosídicos e gentiobiosídicos (Figura 1) (BARBOSA et al., 2003). Forma soluções aquosas viscosas, mesmo em baixas concentrações. Esta β -glucana pode ser produzida em outras fontes de carbono (STELUTI et al., 2004) constituindo-se como uma família de exopolissacarídeos e, embora a cadeia principal seja a mesma, o grau de ramificação do EPS sofre variações (CORRADI DA SILVA et al., 2005). Em estudos realizados com animal de experimentação in vivo, o botriosferana produzido em glucose, apresentou atividade hipoglicemiante e hipocolesterolêmica não sendo observada nenhuma ação mutagênica (MIRANDA et al., 2008).

Para aplicação industrial de um polissacarídeo o mesmo deve apresentar características reológicas interessantes tais como formar soluções viscosas em baixas concentrações, possuir alta solubilidade, manter a viscosidade e estabilidade em ampla faixa de pH, temperatura e na presença de sais. Além disso, para consumo humano como alimento, fármaco e/ou cosmético deve ser metabolizado pelo organismo humano e ter aprovação prévia dos órgãos competentes (MOREIRA et al, 2005).

Embora as análises reológicas sejam utilizadas para estudar o comportamento reológico das soluções formadas pelos polissacarídeos de origem

bacteriana e fúngica, nenhum trabalho foi realizado com os géis formados pelos exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Até o momento, as investigações estão relacionadas com a produção, estrutura e atividade biológica do botriosferana. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar análises reológicas com as soluções dos exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina* MAMB-05, quando cultivado em três diferentes fontes de carbono: glucose, sacarose e frutose. Espera-se que os resultados aqui obtidos possam contribuir futuramente para o emprego destes exopolissacarídeos nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica.

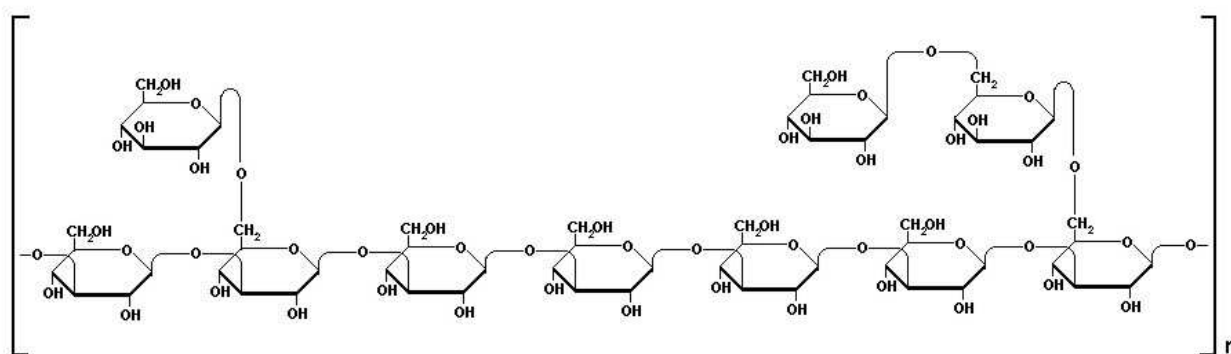


Figura 1. Botriosferana: β -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparo das soluções de exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Steluti e colaboradores (2004), a partir do cultivo do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 nas fontes de carbono glucose (EPS_{GLU}), sacarose (EPS_{SUC}) e frutose (EPS_{FRU}). Os EPS foram solubilizados em água deionizada à temperatura de $\pm 60^\circ\text{C}$, na concentração de 6g/L. As amostras foram mantidas sob agitação mecânica constante, em velocidade média, à temperatura de 22°C por 18 horas. Durante esse período foram realizados três ciclos de aquecimentos a 60°C , por 15

minutos. Após solubilização completa dos EPS, foram realizadas diluições para condução dos experimentos.

2.2. Curvas de Fluxo

As propriedades reológicas das soluções polissacarídicas, em diferentes concentrações, foram determinadas através de ensaios com cisalhamento constante. Foi utilizado um reômetro HAAKE RS75 Rheostress acoplado a um banho termostatizado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3. Foi utilizado o sensor cone-placa com diâmetro de 60mm e ângulo de 2° (α). Foi aplicada uma taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) variando de 10^{-1} a 10^2 s^{-1} com um tempo de 300s para realização das curvas de fluxo. A amostragem foi realizada em triplicata à temperatura 25°C .

2.3. Tixotropia

A determinação da tixotropia foi efetuada em sensor cone-placa (C60/2Ti°) na concentração de 6 g/L, para cada EPS. Foi realizada a curva de histerese (tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento) com taxa de cisalhamento de 10^{-1} a 10^2 s^{-1} , onde se verificou a subida (ascendente) e a descida (descendente) da curva. As análises foram realizadas em triplicata à temperatura de 25°C .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comportamento reológico das soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina* MAMB-05 nas três diferentes fontes de carbono

A curva de fluxo, definida a partir das medidas de tensão de cisalhamento (τ) x taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), permite verificar o comportamento de fluxo das soluções polissacarídicas. A partir da construção do reograma é possível estabelecer se um

líquido apresenta um comportamento de fluxo Newtoniano ou não Newtoniano, em determinadas condições de tensão ou taxa de cisalhamento.

As soluções aquosas dos botriosferanas obtidos nas três diferentes fontes de carbono apresentaram elevada viscosidade mesmo em baixas concentrações e observou-se um aumento da viscosidade com o aumento da concentração de polissacarídeos (Figura 2).

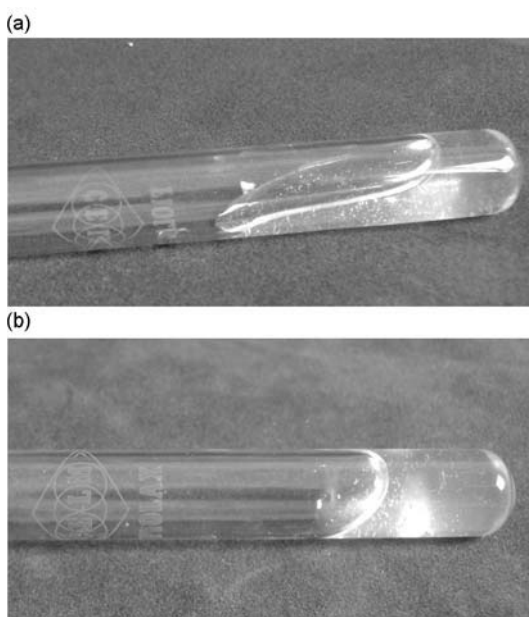


Figura 2. Soluções aquosas do EPS_{GLU} á temperatura 25°C. (a) 3g/L e (b) 6g/L.

De acordo com os reogramas apresentados na figura 3 as soluções polissacarídicas têm comportamento de fluxo de líquidos não Newtonianos e o aumento da tensão de cisalhamento, a partir do aumento progressivo da taxa de cisalhamento, caracteriza as soluções como fluidos pseudoplásticos (NAVARRO, 1997).

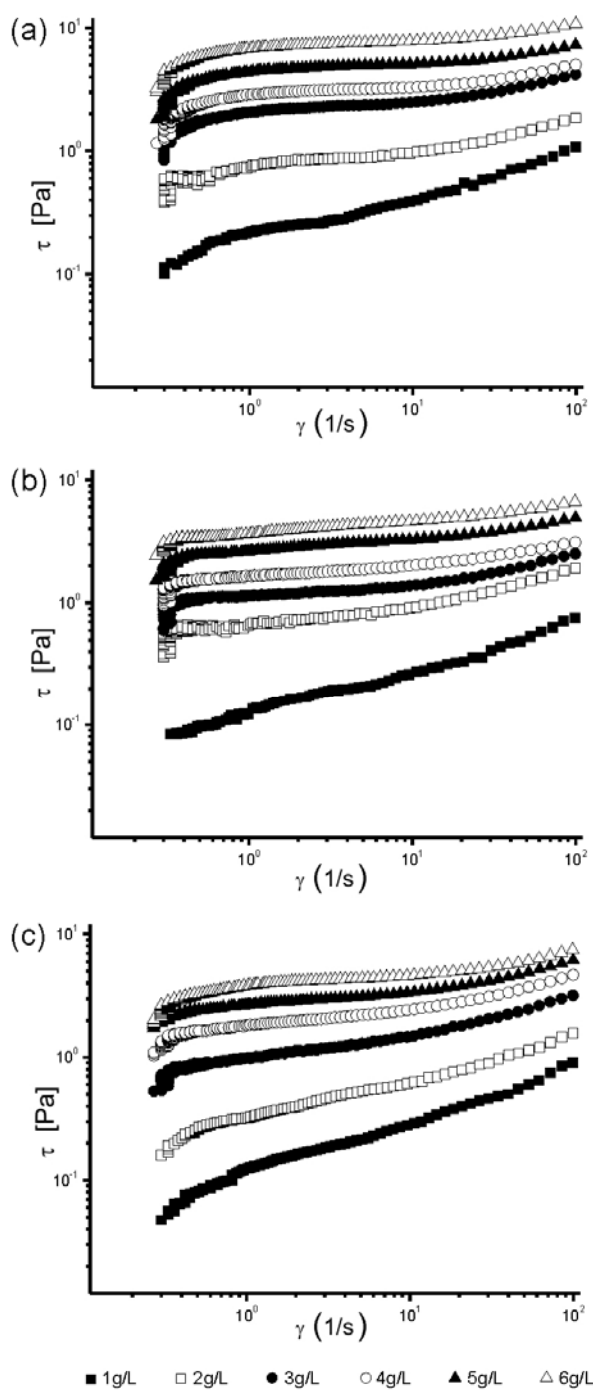


Figura 3. Curvas de Fluxo (tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento) das soluções polissacarídicas dos (a) EPS_{GLU} , (b) EPS_{SAC} e (c) EPS_{FRU} , nas concentrações de 1g/L a 6g/L, à temperatura de 25°C.

Rottava (2005) observou comportamento semelhante de pseudoplasticidade para a goma xantana, produzida por diferentes espécies da bactéria *Xanthomonas* sp, que é, atualmente, o polímero mais utilizado pela indústria, apresentando

propriedades de espessante e estabilizante, com comportamento pseudoplástico estável em uma larga faixa de pH, concentração iônica e temperatura (GARCIA-OCHOA et al., 2000). Bae e colaboradores (2008) estudaram o comportamento reológico das soluções do exopolissacarídeo levana, produzido pela *Microbacterium laevaniformans*, e os resultados encontrados demonstraram que as soluções de levana também apresentavam comportamento pseudoplástico.

A característica pseudoplástica vista nas glucanas produzidas pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, também foi observada nos estudos reológicos da escleroglucana, uma β -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana, produzida por fungos do gênero *Sclerotium* (GRASSI et al., 1996). Já se propõe a utilização de escleroglucana para diminuir a sinerese (exsudação espontânea da água), melhorando a qualidade dos alimentos (VIÑARTA et al., 2006).

3.2 Tixotropia

A tixotropia descreve o comportamento de substâncias que passam do estado gel de alta viscosidade para o estado de solução com viscosidade muito baixa, como resultado de um alto cisalhamento por um período de tempo relativamente longo. Um importante critério da tixotropia é o processo reversível de reespessamento da substância, quando deixada em repouso. Testes reológicos em que a amostra é submetida ao aumento da taxa de cisalhamento, seguida pela diminuição da taxa, servem para observar a tixotropia do material, cuja ocorrência é verificada quando a curva de aumento não coincide com a curva de decréscimo da taxa e o diagrama resultante é denominado de curva de histerese (BARNES, 1997).

As curvas de histerese dos exopolissacarídeos estudados neste trabalho mostraram que todos apresentam comportamento tixotrópico (Figura 4). Amido de

milho e combinações de amido de milho com gomas xantana, arábica e guar (KORUS et al., 2004) apresentam comportamento semelhante.

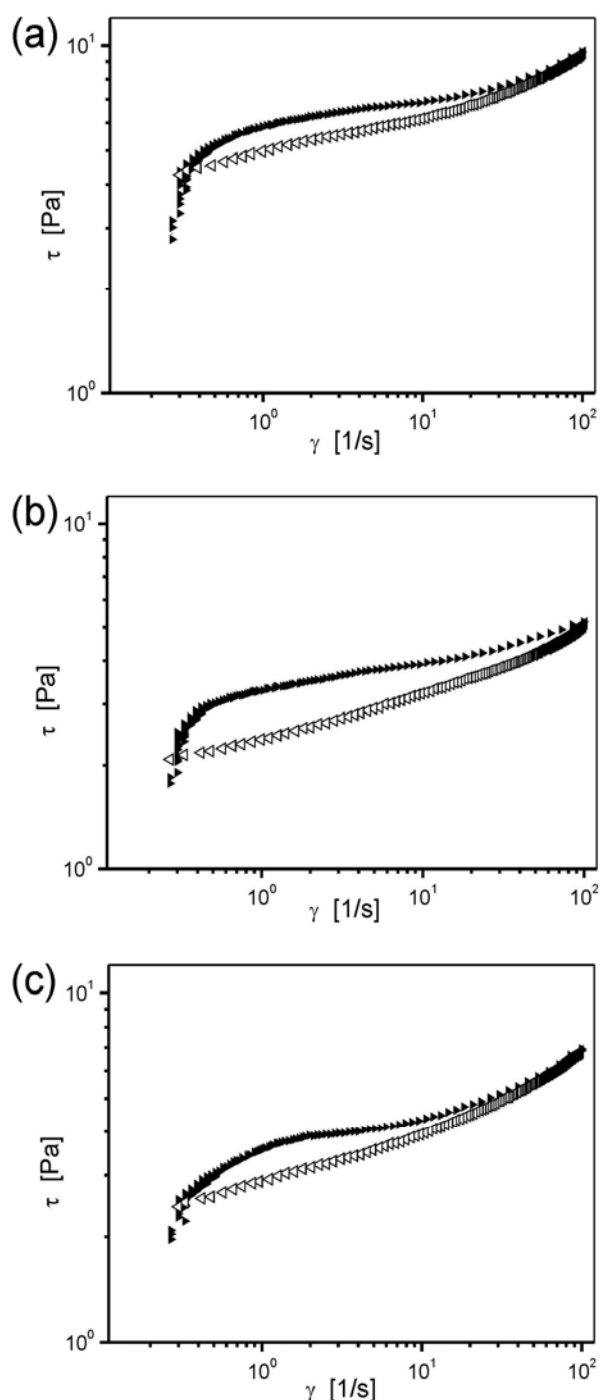


Figura 4. Curvas de Histerese (tensão de cisalhamento x taxa de deformação) das soluções polissacarídicas dos (a) EPS_{GLU} , (b) EPS_{SAC} e (c) EPS_{FRU} na concentração de 6g/L, à temperatura de 25°C. Curva ascendente (símbolos preenchidos), curva descendente (símbolos abertos).

Mao e colaboradores (2007) estudaram o comportamento tixotrópico e a conformação em tripla hélice do exopolissacarídeo grifolana, uma β -(1,3)-D-glucana, produzida pelo fungo *Grifola frondosa*. Considerando os resultados encontrados os pesquisadores inferiram que o comportamento tixotrópico do gel de grifolana poderia ser atribuído à ruptura de agregados da tripla hélice, sob cisalhamento. EPS_{GLU}, EPS_{SAC} e EPS_{FRU} também apresentam conformação em tripla hélice, nos experimentos com Congo Red (dados não apresentados), portanto, a desagregação de suas cadeias, sob alto cisalhamento, poderia ser a causa do comportamento tixotrópico dessa família de polissacarídeos. O mesmo fenômeno foi observado para o escleroglucana (GRASSI et al., 1996), também um polímero que apresenta conformação em tripla hélice (FARIÑA et al., 2001). O escleroglucana é, hoje, o polímero de origem fúngica com maior aplicação industrial, principalmente nas áreas farmacêutica e alimentícia (COVIELLO et al., 2007).

Os produtos tixotrópicos possuem algumas vantagens tecnológicas, pois tendem a apresentar maior vida de prateleira (shelf-life) durante o armazenamento, mantendo a viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (CORRÊA et al., 2005). A obtenção de formulações de uso tópico com caráter tixotrópico é bastante almejada, pois se deformam durante a aplicação tornando-se mais fluídas e, conseqüentemente, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, evitando que o produto escorra (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2003).

Os materiais tixotrópicos possuem inúmeras aplicações tecnológicas, portanto a manifestação desse comportamento nos exopolissacarídeos produzidos pelo *B. rhodina* nos permite acreditar que uma investigação mais minuciosa no

campo da reologia poderá prover informações valiosas para aplicação do botriosferana nos diferentes setores industriais.

4. CONCLUSÕES

As soluções aquosas dos exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, nas três diferentes fontes de carbono, apresentaram comportamento de fluxo de líquidos não Newtonianos, com características de fluidos pseudoplásticos. O comportamento tixotrópico foi identificado nas três soluções. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de alguns polissacarídeos microbianos, que hoje são amplamente utilizados pela indústria.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 05/53879-3) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES, bolsa de mestrado ao aluno RAMB), UFPR, Pronex-Carboidratos e Rede Nanoglicobiotechnology-CNPq, Fundação Araucária (Projeto Nº 5777) e ao CNPq (Projeto Nº 474340/2006-6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAE, I. Y.; IM-KYUNG, O.; LEE, S.; YOO S. H.; LEE, H. G. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 10-13, 2008.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. C. Structural characterization of *botryosphaeran*: (1→3,1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691-1698, 2003.
- BARNES, H. A. Thixotropy a review. **Journal Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 70, p.1-33, 1997.

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→3;1→6)-β-glucan from *Botryosphaeria* sp. produced in two different carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 10-17, 2005.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 73-78, 2005.

COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F.; DORIGO, A.; MATRICARDI, P.; GRASSI, M. Two galactomannans and scleroglucan as matrices for drug delivery: preparation and release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 200–209, 2007.

FARIÑA, J. I.; SIÑERIZ, F.; MOLINA, O. E.; PEROTTI, N. I. Isolation and physicochemical characterization of soluble scleroglucan from *Sclerotium rolfsii*. Rheological properties, molecular weight and conformational characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 41–50, 2001.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behaviour and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.

GRASSI, M.; LAPASIN, R; PRIC, S. A study of the rheological behavior weak gel systems of scleroglucan. **Carbohydrate Polymers**, v. 29; p. 169-181; 1996.

KORUS, J.; JUSZCZAK, L.; WITCZAK, M.; ACHREMOWICZ, B. Influence of selected hydrocolloids on triticale starch rheological properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 641–652, 2004.

MAO, C. F.; HSU, M.; HWANG, W. Physicochemical characterization of grifolan: thixotropic properties and complex formation with Congo Red. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 502–510, 2007.

METHACANON, P.; MADLA, S.; KIRTIKARA, K.; PRASITSIL, M. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 199–203, 2005.

MIRANDA, C. C. B. O.; DEKKER, R. F. H.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 172-177, 2008.

MOREIRA, A. N.; MOREIRA, A. S.; DIA, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; DEL PINO, F. A. B. Comportamento reológico e composição química do biopolímero da bactéria *Beijerinckia* sp 7070 produzido por via enzimática. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 135-142, 2005.

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. 1. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 1997. 264 p.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp. para produção de goma xantana**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguia e das Missões, Campus de Erechim-RS.

STELUTI, R. M.; GIESE E. C.; PIGATO, 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. Comparasion of botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech January**, v. 16, p. 41-46, 1998.

VIÑARTA, S. C.; MOLINA, O. E.; FIGUEROA, L. I. C.; FARIÑA, J. I. A further insight into the practical applications of exopolysaccharides from *Sclerotium rolfsii*. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 619–629, 2006.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 4-19, 2007.