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

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

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Rhizobium* e *Mesorhizobium*

NILSON KOBORI MONTEIRO

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2011

NILSON KOBORI MONTEIRO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Rhizobium* e *Mesorhizobium*

Orientadora:

Profª Drª Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva

(FCT/UNESP – Presidente Prudente – SP)

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2011

NILSON KOBORI MONTEIRO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Rhizobium* e *Mesorhizobium*

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre Engenharia e Ciência de alimentos, área de Estrutura de Carboidratos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr.Gil Valdo José da Silva
Professor Associado
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Maurício Boscolo
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

Profª Drª Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva
Professora Livre Doscente
UNESP – Presidente Prudente

São José do Rio Preto, 19 de maio de 2001.

Monteiro, Nilson Kobori.
Caracterização estrutural de polissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* / Nilson Kobori Monteiro. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.
94 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bioquímica. 2. Polisacarídeos microbianos – Características estruturais. 3. Exopolissacarídeos. 4. *Rhizobium*. 5. *Mesorhizobium*. I. Silva, Maria de Lourdes Corradi Custódio da. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.124.5

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto – UNESP

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me presentear com sua maior dádiva e meu mais precioso tesouro: minha vida.

Aos meus pais, Benedito e Neusa (*in memorian*), por sempre estarem ao meu lado, apoiando minhas decisões e acima de tudo por me proporcionarem suporte emocional e serem meus maiores exemplos de vida.

A minha irmã Nathalya, por estar presente nos momentos fáceis e, principalmente, nos difíceis, sempre disposta a ajudar.

Agradeço especial a minha avó Maria (*in memorian*), por ter me criado e acompanhado por toda minha vida, sempre acreditando e apoiando minha jornada, mesmo sentindo saudade de seu "netão". Vó sinto falta de seu sorriso ao me receber na porta de casa, de sua dedicação e amor.

Aos muitos amigos que fiz durante minha estada em Rio Preto, entre eles meus antigos companheiros de casa "Gaucho" e o "Bixo" pelos momentos de diversão e descontração que vivemos.

A amiga e companheira, Tainara Costa, pelos inúmeros cafezinhos no Marcão, o que nada mais era do que uma desculpara para ficar "de papo para o ar", por seu carinho, paciência e principalmente por sua companhia, da qual sempre gostei muito. Nunca me esquecerei dos momentos maravilhosos que passei ao seu lado. T.A.E.

A também amiga e companheira para todos os momentos Carolina Veronezi, por sempre estar disponível para ouvir meus problemas, puxar minhas orelhas quando necessários e principalmente pelos sábios conselhos, os quais nunca cobrava nada, afinal "companheiro é companheiro, FDP é FDP".

À minha orientadora Profa Dra Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva que me acompanha a nada mais nada menos que 7 anos. Muito obrigado pela dedicação e confiança, por ter me mostrado o que é pesquisa, e como a fazer de um modo honesto e

ético. Pelos puxões de orelha nos momentos necessários e apoio e palavras de incentivo quando nos momentos certos. Alem de ser meu exemplo profissionalismo e companheirismo.

Às amigas Ana Flora Dalberto Vasconcelos e Marilsa de Stefani Cardoso por sempre se preocuparem comigo e estarem a disposição para conversar e puxar minhas orelhas (e olha que não foram poucos). As considero minhas tias adotivas.

Aos colegas do Laboratório de Química de Carboidratos da Unesp de Presidente Prudente Samara, Gabriel, Diego, Vinicius e Marcos por fazerem do laboratório um ambiente agradável para se trabalhar. Um agradecimento especial ao Diego, por me auxiliar durante as etapas de meu trabalho, e ao Gabriel pelo suporte nas analises de HPSEC/RID.

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

Ao programa de Pós-Graduação da Unesp - São José do Rio Preto.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos Unesp - São José do Rio Preto.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

À todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização deste trabalho.

À todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

“Crescer significa mudar e mudar envolve riscos, uma passagem do conhecido para o desconhecido.”

- Autor desconhecido

RESUMO

Bactérias do gênero *Rhizobium* são conhecidas por manterem uma relação simbiótica com determinadas plantas leguminosas e atuam como fixadores biológicos de nitrogênio. Elas vêm sendo estudadas em relação à produção de exopolissacarídeos (EPS), o qual acredita-se estar relacionado com o processo de reconhecimento e invasão do microrganismo na planta hospedeira. Estas moléculas apresentam propriedades físico-químicas e reológicas interessantes para a indústria alimentícia, podendo ser aplicadas como estabilizantes, emulsificantes ou gelificantes. Estudos da estrutura química realizados em quatro EPS produzidos por *Rhizobuim tropici* (em dois meios de cultivos diferentes), *Mesorhizobium* e *Rhizobium sp* os caracterizaram como sendo heteropolímeros. Esses polímeros são constituídos principalmente por glucose e galactose, com traços de manose, apresentando ácido urônico, acetila e piruvato com substituintes. Por cromatografia de gel permeação e eletroforese em gel de poliacrilamida apenas os polímeros produzidos por *Rhizobium tropici* (R_2) e *Mesorhizobium* (R_3) comportaram-se como moléculas homogêneas com baixo grau de polidispersividade. Estes EPS foram paracialmente caracterizados utilizando-se técnicas de FT-IR, RMN de ^{1}H e ^{13}C.

Palavras chave: Exopolissacarídeo, Rhizobeacea, *Rhizobium tropici, Mezorhizobium*.

ABSTRACT

Bacteria of the *Rhizobium* genus are known to maintain a symbiotic relationship with certain leguminous plants and they act as biological nitrogen fixation. They have been studied as exopolysaccharides (EPS) producers, which may be related to the recognition process and to the microorganism invasion into the host plant. These molecules exhibit interesting physical-chemical and rheological properties for the food industry since they can be used as stabilizers, emulsifiers or gelling agents. Studies of the chemical structure of four EPS produced by *Rhizobium tropici* (in two different culture media), *Mesorhizobium* and *Rhizobium* sp have characterized them as heteropolymers. The EPS are constituted mainly by glucose and galactose with traces of mannose besides uronic acid, pyruvate and acetyl as substituents. Gel permeation chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis showed that the polymers produced by *Rhizobium tropici* (R_2) and *Mesorhizobium* (R_3) behaved as homogeneous molecules with low polydispersity. Thus these two EPS were partially characterized by the techniques of FT-IR, ^{1}H and ^{13}C NMR.

Keywords: Exopolysaccharide, Rhizobeacea, *Rhizobium tropici*, *Mezorhizobium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fragmento da estrutura química de um polímero de dextrana contendo uma substituição..... 20

Figura 2: Estrutura química de um polímero de levana..... 21

Figura 3: Estrutura química de um polímero de gelana..... 22

Figura 4: Estrutura da unidade pentassacarídica repetitiva da xantana..... 23

Figura 5: Esquema mostrando a seqüência de reações para obtenção de acetatos de alditóis parcialmente metilados, a partir de um polissacarídeo nativo (a metilação segue o procedimento de Ciucanu e Kerek)..... 31

Figura 6: Representação esquemática dos núcleos de átomos na ausência e presença de campo magnético. (Adaptado de BRUICE, 2006)..... 36

Figura 7: Estruturas químicas dos compostos a) TMS e b) HDMS..... 37

Figura 8: Estrutura química do corante vermelho congo..... 49

Figura 9: Perfil de eluição para os EPS R_1 (a), R_2 (b), R_3 (c) e R_4 (d) por HPSEC equipado com um detector de índice de refração diferencial. Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de 7.10^6, 4.10^5, 8.10^4 e 5.10^3. Total de EPS aplicado: 200 μg; fluxo: 0,6 mL/min. Eluente: $NaNO_3$ 0,1M contendo 0,03% de azida sódica, pressão de 1422 Psi a 37 ºC..... 53

Figura 10: Curva de calibração de massa molecular aparente obtida por HPSEC equipado com detector de índice de refração diferencial. Padrões de massa molecular de a) $2,1x10^6$ Da, b) $1,4x10^6$ Da, c) $6,7x10^5$ Da, d) $5,0x10^5$ Da, e) $2,6x10^5$ Da, f) $1,5x10^5$ Da, g) $7,2x10^4$ Da e h) $5,0x10^4$ Da..... 54

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corrida com tampão fosfato de sódio pH 7,6 e corada com azul de toluidina. Condições de corrida: 110V por 1h45min. Materiais aplicado: (a) padrão de ácido poligalactourônico, (b) EPS R_1, (c) EPS R_2, (d) EPS R_3 e (e) EPS R_4..... 56

Figura 12: Análise conformacional dos EPS R_2 e R_3 de acordo com a mudança de absorção máxima do complexo Vermelho Congo-EPS, em diversas concentrações de NaOH. Vermelho Congo e dextrana foram utilizados como controles..... 58

Figura 13: Espectros de infravermelho acoplados ao transformador Fourier (região de 3800 a 600 cm^{-1}) dos EPS R_2 e R_2 metilado (superior) e R_3 e R_3 metilado (inferior). 62

Figura 14: Espectro de FT-IR obtido do EPS R_2 produzido pelo microrganismo *Rhizobium tropici* - a) 3800 a 600 cm^{-1} e b) 1200 a 600 cm^{-1}..... 64

Figura 15: Espectro de RMN a) ^{1}H e b) ^{13}C obtido do EPS R_2 produzido pelo microrganismo *Rhizobium tropici.* Obtido em óxido de deutério a 70 °C utilizando-se freqüência de 400 MHz para prótons e 100 MHz para ^{13}C.. 66

Figura 16: Prováveis estruturas químicas para o EPS R_2..... 69

Figura 17: Espectro de FT-IR obtido do EPS R_3 produzido pelo microrganismo *Mesorhizobium* nas regiões de a) 3800 a 600 cm^{-1} e b) 1200 a 600 cm^{-1}. 71

Figura 18: Espectro de RMN a) ^{1}H e b) ^{13}C obtido do EPS R_3 produzido pelo microrganismo *Mesorhizobium.* Obtido em óxido de deutério a 70 °C utilizando-se freqüência de 400 MHz para prótons e 100 MHz para ^{13}C..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de polissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas. 27

Tabela 2 - Ensaio analítico para a formação do complexo CR/EPS..... 50

Tabela 3: Quantificações de açúcares totais e redutores, proteínas, piruvato, acetila e ácido urônico dos EPS produzidos por diferentes linhagens de bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium*..... 51

Tabela 4: Composição em monossacarídeos dos EPS R_2 e R_3 em três condições de hidrólises diferentes..... 61

Tabela 5: Atribuições realizadas para os espectros de RMN de prótons e carbono-13 do EPS R_2..... 68

Tabela 6: Atribuições realizadas para os espectros de RMN de prótons e carbono-13 do EPS R_3..... 73

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

^{13}C	Carbono 13
1D	Unidimensional
^{1}H	Prótons
2D	Bidimensional
BSA	Albumina de soro bovino
COSY	Espectro de correlação de prótons
CR/EPS	Complexo EPS - Vermelho congo
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMS	Sulfato de dimetila
EPS R_1	Exopolissacarídeo produzido por *Rhizobium tropici* (condição 1)
EPS R_2	Exopolissacarídeo produzido por *Rhizobium tropici* (condição 2)
EPS R_3	Exopolissacarídeo produzido por *Mesorhizobium*
EPS R_4	Exopolissacarídeos produzido por *Rhizobium* sp.
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GC	Cromatografia gasosa
HPSEC	Cromatografia de gel permeação
HETCOR	Correlação heteronuclear
HMBC	Coerência heteronuclear
HMDS	Hexametildisiloxano
HMQC	Coerência multiquântica heterenoclear
MWCO	Massa molecular de corte (Molecular Weight Cut off)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAS	Ácido periódico / reagente de Schiff
Pyr	Piruvato
RMN	Ressonância magnética nuclear
Succ	Succinil
TFA	Ácido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Espectro de correlação total
ΔE	Energia quantizada

Sumário

1. INTRODUÇÃO 15
2. OBJETIVOS 16
2.1. Objetivo geral 16
2.2. Objetivos específicos 16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
3.1 Polissacarídeos 17
3.2 Polissacarídeos bacterianos 18
3.2.1. Dextrana 19
3.2.2. Levana 20
3.2.3. Gelana 21
3.2.4. Xantana 22
3.2.5 Outros exopolissacarídeos bacterianos em estudo 24
3.3 EPS produzidos por bactérias do gênero **Rhizobium** 25
3.4 Caracterização química estrutural de polissacarídeos 29
3.4.1. Hidrólise ácida 30
3.4.3. Métodos cromatográficos 32
3.4.4. Espectrometria no infravermelho 34
3.4.5 Ressonância magnética nuclear 35
4. MATERIAIS E MÉTODOS 39
4.1 Materiais 39
4.1.1. Obtenção do exopolissacarídeo 39
4.1.2. Reagentes 39
4.1.3. Equipamentos 39
4.2. Métodos 40
4.2.1. Preparo dos exopolissacarídeos 40
4.2.2. Determinação de açúcares totais - método do fenol - ácido sulfúrico 40
4.2.3. Determinação dos açúcares redutores - método de Somogyi – Nelson 40
4.2.4. Determinação de proteínas - método de Bradford 41
4.2.5. Determinação de ácidos urônicos - método de Blumenkrants modificado ... 42
4.2.6. Determinação do teor de piruvato 42
4.2.7. Determinação do teor de acetila 43
4.2.8. Hidrólise Ácida Total 43
4.2.9. Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica (HPAEC) 44
4.2.10. Análise das Ligações Glicosídicas dos Polissacarídeos 44

4.2.10.1. Metilação dos EPS pelo método de Ciucanu e Kerek (1984)..... 44
4.2.10.2. Hidrólise e redução química..... 45
4.2.10.3. Acetilação..... 45
4.2.11. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)... 46
4.2.12. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono 13 46
4.2.13. Análise da homogeneidade e determinação de massa molecular por Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC)...... 46
4.2.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)..... 47
4.2.15. Análise conformacional..... 49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
5.1. Quantificação dos polissacarídeos..... 51
5.2. Análise da homogeneidade dos diferentes EPS..... 52
5.2.1. Análises de homogeneidade e determinação de massa molecular aparente por HPSEC..... 53
5.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida 55
5.3. Determinação da conformação da cadeia em solução..... 57
5.3. Hidrólise ácida total e análise por HPAEC/PAD dos exopolissacarídeos R_2 e R_3 em três condições diferentes...... 59
5.5. Comparação dos espectros de FT-IR dos exopolissacarídeos R_2 e R_3 nativos e metilados 62
5.6. Análises espectroscópicas do exopolissacarídeo produzido pela bactéria Rhizobium tropici (EPS R2)..... 63
5.6. Análises espectroscópicas do exopolissacarídeo produzido pela bactéria* Mesorhizobium *(EPS R_3) 70
6. CONCLUSÕES..... 74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

1. INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) são macromoléculas excretadas, no meio de cultivo, por alguns microrganismos. A possibilidade de utilização desses compostos nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica incrementou a pesquisa nesse campo. A rapidez de obtenção, produção independente do clima e reprodutibilidade de propriedades físico-químicas são algumas das vantagens da substituição dos polímeros de origem vegetal por exopolissacarídeos de microrganismos.

Uma das principais propriedades dessas macromoléculas é a capacidade de alterarem as características físicas do meio onde se encontram, atuando como estabilizantes, espessantes, gelificantes, agentes modificadores de textura e crio protetores, justificando, portanto, o interesse dos diferentes setores industriais. Os EPS podem formar soluções aquosas altamente viscosas, mesmo em baixas concentrações, o que é considerado um atrativo à aplicação industrial.

Bactérias diazotróficas, fixadoras de nitrogênio, são capazes de sintetizar EPS durante o processo de infecção e nodulação nas raízes das plantas hospedeiras, numa relação considerada simbiótica, na qual utilizam a fonte de carbono proveniente da fotossíntese realizada pela planta e fornecem nitrogênio inorgânico ao organismo hospedeiro. Entre os microrganismos que apresentam essa relação simbiótica estão as bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium,* que são capazes de produzir grandes quantidades de EPS.

Neste trabalho foram selecionados alguns exopolissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* que, depois de isolados, foram caracterizados quimicamente, pelas técnicas convencionais utilizadas na química de carboidratos como hidrólise, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono e próton, entre outras. A caracterização química associada ao estudo das propriedades físico-químicas fornece subsídios para a possibilidade de aplicação industrial dessas macromoléculas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente projeto tem como objetivo geral caracterizar estruturalmente os exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias *Rhizobium tropici* (EPS-R_2) e *Mesorhizobium* (EPS-R_3).

2.2. Objetivos específicos

- Detectar e quantificar os componentes constituintes, carboidratos e não carboidratos, dos EPS estudados
- Efetuar hidrólise ácida para determinação e quantificação dos constituintes monossacarídicos dos EPS
- Determinar a configuração e posição da ligação glicosídica por FT-IR e RMN-^{13}C e ^{1}H
- Determinar a massa molecular por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC) e a homogeneidade por GPC e eletroforese em gel de poliacrilamida.
- Analisar a conformação estrutural dos EPS produzidos pelas duas estirpes de rizóbios.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polissacarídeos

Juntamente com os ácidos nucléicos e as proteínas, os polissacarídeos determinam a funcionalidade e especificidade de uma espécie, encontram-se amplamente disseminados na natureza e possuem uma estrutura altamente organizada. (KAJIWARA; MIYAMOTO, 2005)

A grande maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, que são biopolímeros de elevada massa molecular, denominados também de glicanos. Diferem entre si na identidade de suas unidades (monossacarídeos), nos tipos de ligação glicosídica que as unem, no comprimento de suas cadeias e no grau de ramificação das mesmas. São formados a partir da eliminação de uma molécula de água entre o grupo hidroxila hemiacetal de um resíduo e um grupo hidroxila primária ou secundária de outro resíduo adjacente, com suas massas molares variando de milhares a milhões de daltons (PAZUR, 1994, NELSON; COX, 2002).

As unidades monoméricas dos polissacarídeos são denominadas sacarídeos, também chamados de açúcares ou carboidratos, devido a sua fórmula molecular $C_x(H_2O)_x$ ou $C_xH_{2x}O_x$ onde x normalmente varia entre 5 e 6 representando um hidrato de carbono (FOX; WHITESELL, 1994).

Estruturalmente podem ser classificados como homopolissacarídeos, quando todos os monômeros são iguais, e heteropolissacarídeos, quando existem dois ou mais monômeros diferentes (MARGARITIS; PACE, 1985; NELSON; COX, 2002). Como exemplo de homopolímero pode-se citar o dextrana, constituído unicamente por glucose, produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGES 2000; NAESSENS et al. 2005); e exemplo de heteropolímero a goma gelana, formada por glucose, ácido glucurônico e ramnose, sintetizada pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*. (BANIK; KANARI; UPADHYAY, 2000).

Os polissacarídeos são produzidos por todos os organismos vivos, exibindo diferentes tipos de funções fisiológicas e aplicações. (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004). Por apresentarem características reológicas interessantes como estabilidade em altas temperaturas, em ampla faixa de pH e de concentração iônica, a demanda por esses biopolímeros vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, sendo utilizados como emulsificantes, gelificantes e estabilizantes em diferentes

segmentos industriais, em especial nos ramos alimentício, cosmético e farmacêutico (VUYST; DEGEEST, 1999; BUENO; GARCIA CRUZ, 2001; SELBMANN et al., 2002; ČERNÁ et al., 2003; KUMAR; MODY; JHA, 2007). Diversos microorganismos são capazes de sintetizá-los e excretá-los como polímeros solúveis ou insolúveis em meio aquoso (KUMAR; MODY; JHA, 2007).

3.2 Polissacarídeos bacterianos

A produção de polissacarídeos de origem microbiana vem emergindo como uma importante fonte de matéria prima para diversos segmentos industriais, inclusive na indústria alimentícia onde essas macromoléculas podem ser usados “in natura” como aditivos seguros (VIJAYENDRA et al., 2008). Polissacarídeos bacterianos já são aplicados industrialmente, podendo se equiparar às gomas produzidas por outras fontes naturais como de algas marinhas e de plantas (KUMAR, MODY; JHA, 2007).

Muitos polissacarídeos empregados na indústria são provenientes de plantas e algas devido ao baixo custo de produção, uma vez que a obtenção de polissacarídeos por microrganismos ainda é considerada dispendiosa, entretanto a atenção que estes materiais vêm recebendo tem crescido nos últimos 50 anos (SUTHERLAND 2001; CANILHA et al., 2006, ASKER, SHAWKY, 2010). Esse interesse é atribuído ao fato dessas moléculas apresentarem propriedades físicas e químicas reprodutíveis, uma vez que os microrganismos são cultivados em condições controladas e pré-estabelecidas, gerando moléculas estruturalmente semelhantes (TONELI; MURR; PARK, 2005; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Somam-se a esses benefícios uma produção independente do clima, rápida obtenção do produto e a necessidade de pouco espaço físico (SOUZA E GARCIA-CRUZ, 2004).

Na indústria alimentícia, os polissacarídeos de plantas e algas são utilizados como espessantes e gelificantes. Porém, as quantidades disponíveis não são suficientes para atender a demanda, por isso polissacarídeos de origem microbiana tem sido obtidos e utilizados tais como as gomas xantana produzida pelo *Xanthomanas campestris* (GARCIA-OCHOA et al., 2000) e gelana, pelo *Sphingomonas paucimobilis* (SUTHERLAND, 1999; BANIK; KANARI; UPADHYAY, 2000).

Após estabelecidas as condições, a facilidade na obtenção de muitos polissacarídeos faz com que os custos de produção sejam reduzidos se comparados aos

custos dos polímeros sintetizados artificialmente (NISHINARI; TAKAHASHI, 2003; COVIELLO, 2007). Além disso, os polímeros naturais são biodegradáveis e podem ser facilmente convertidos em diferentes derivados devido a sua reatividade frente a muitos compostos (RENAUD; BELGACEM; RINAUDO, 2005).

Nos microrganismos, os polissacarídeos podem ser constituintes da parede celular na forma de lipopolissacarídeos (LPS), podem estar ligados a parede celular como polissacarídeos capsulares (CPS) ou ainda serem secretados para o meio extracelular na forma de exopolissacarídeos (EPS) (SUTHERLAND, 1998; BOELS et al., 2001). Os EPS são polímeros de cadeias longas produzidos principalmente pelas bactérias e pelas microalgas no meio de cultivo e não são conectados, por ligações químicas, à superfície celular microbiana. Outro grupo de polissacarídeos muito semelhantes aos EPS, entretanto quimicamente ligados à superfície da célula são classificados como polissacarídeos capsulares (LAWS; GU; MARSHALL, 2001; KUMAR, MODY; JHA, 2007)

Muitas bactérias gram-negativas e gram-positivas são conhecidas como produtoras de EPS (KUMAR, MODY e JHA, 2007) os quais vêm sendo estudados e produzidos comercialmente, tais como dextrana, levana, gelana e xantana (SELBMANN, 2002).

3.2.1. Dextrana

O termo dextrana descreve uma família de homopolissacarídeos bacterianos extracelulares, constituídos majoritariamente por unidades α-D-glucopiranosídicas unidas por ligações do tipo (1→6) com até 5% de ramificações do tipo α-(1→3) (figura 1). É um polissacarídeo solúvel em água, utilizado há mais de cinco décadas, sintetizado principalmente pelas bactérias *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum* em processo fermentativo descontínuo, com massa molecular variando entre 1 a 20 x 10^6 Da. É sintetizado pela atuação de diversas enzimas como as dextranassacarases, glucanassacarases e glicosiltransferases, a partir de sacarose como substrato (MEHVAR, 2000; STENEKES; TALSMA; HENNINK, 2001; GIL et al., 2008, VIET; BECK-CANDANEDO; GRAY, 2008; PATEL et al., 2010).

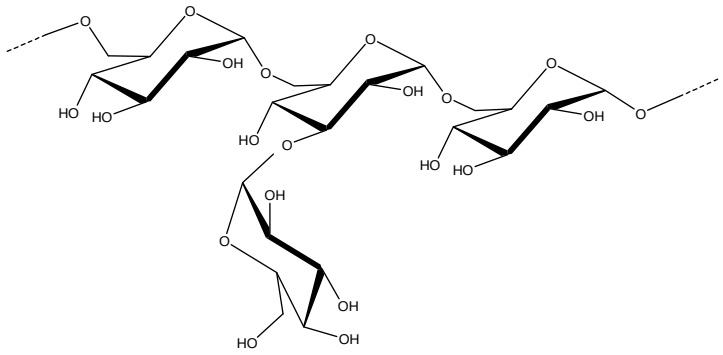

Figura 1: Fragmento da estrutura química de um polímero de dextrana contendo uma substituição.

O principal uso industrial da dextrana é a produção de géis com diferentes graus de porosidades, resultantes de ligações cruzadas. Pode ser utilizada como fase estacionária em colunas de separação por exclusão de tamanho (MARGARITIS; PACE, 1985). Na indústria de alimentos pode ser utilizada como inibidor de cristalização e como biofilmes. A indústria denominada Pharmacia (Suécia) é a maior produtora mundial de dextrana e soluções de dextrana. Outras empresas produtoras deste polímero são: Fisons (Reino Unido), Meito (Japão), Pfeiffer & Langen e UEB Sermwerke (Alemanha) e Polfa (Polônia). Alguns produtores de dextrana clínica, utilizada como espessante do plasma sanguíneo, são Pharmacia (EUA e Suécia), Knoll/Schiwa (Alemanha), Abbott (EUA), Travenol (EUA) e Fisons (Reino Unido) (CRUZ PRADELA, 2006).

.

3.2.2. Levana

A goma levana é um polímero atóxico e biologicamente ativo constituído de unidades β-D-frutofuranosídicas em ligações (2→6) com uma ramificação β(2→1) a cada nove unidades da cadeia principal (figura 2). É sintetizada através de reações de transfrutosilação por muitas espécies de bactérias como o *Bacillus subtilis* e o *Zymomonas mobilis*, mas também pode ser encontrada em diversas plantas; é considerada subproduto do processo de fermentação para produção de etanol, responsável pela elevação da viscosidade do xarope de cana-de-açúcar. Na indústria de alimentos a goma levana é utilizada como emulsificante, estabilizante, agente encapsulante e veículo para corantes e aromas. A alta solubilidade e a baixa viscosidade das soluções aquosas de levana, quando comparada com outras gomas, postulam-na

como uma possível substituta da goma arábica (WENDT, 2001, MELO, et al., 2008; BAE, et al., 2008; SHIH; CHEN; WUB, 2010),

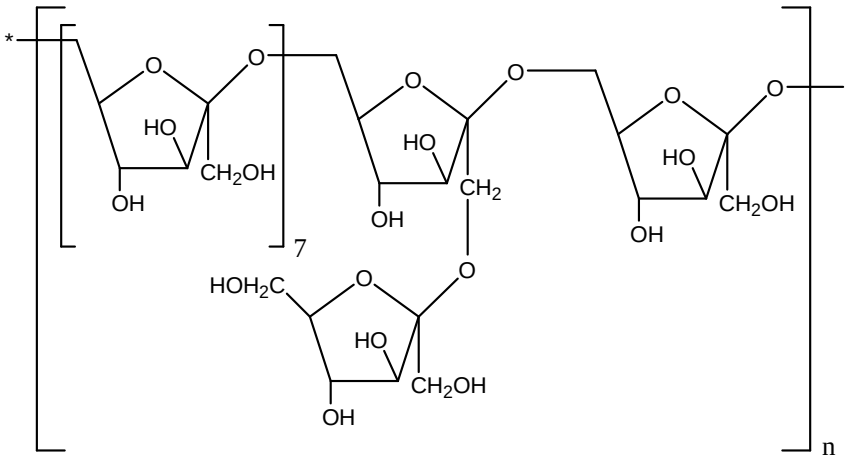

Figura 2: Estrutura química de um polímero de levana.

3.2.3. Gelana

Outro polissacarídeo empregado na indústria de alimentos é a goma gelana, produzida pela bactéria *Sphingomonas elodea*, constituída por unidades de glucose, ácido glucurônico e L-rhamnose nas relações molares de 2:1:1, respectivamente, como mostrado na figura 3. Foi produzida em laboratório pela primeira vez em 1978 nos Estados Unidos e liberada para uso, em alimentos, no Japão em 1988 e, em 1992, teve seu uso como aditivo alimentar aprovado pela FDA - Food and Drug Administration (SYLVAIN; LACROIX, 1999; JAMPEN; BRITT; TUNG, 2000; BAJAJ et al., 2007).

Possui boa estabilidade na faixa de pH de 3,5 a 8. A estabilidade em valores baixos de pH permite que esta goma seja empregada em produtos à base de frutas (SYLVAIN; LACROIX, 1999). Outras aplicações da gelana na indústria alimentícia são em alimentos congelados, por apresentar excelente capacidade de dilatação e em geléias, gelatinas e iogurtes devido a sua estabilidade e resistência (CRUZ PRADELA 2006). Também pode ser usada como texturizante, estabilizante, espessante, emulsificante e agente gelificante (JIN et al., 2003).

A goma gelana produzida pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis* pode ser usada em menor concentração na presença de alguns cátions para produzir um gel transparente e termorreversível. Foi, inicialmente, comercializada pela empresa

norte americana Kelco, sendo oferecida como um substituto do Agar (TRIVENI; SHAMALA; RASTOGI, 2001).

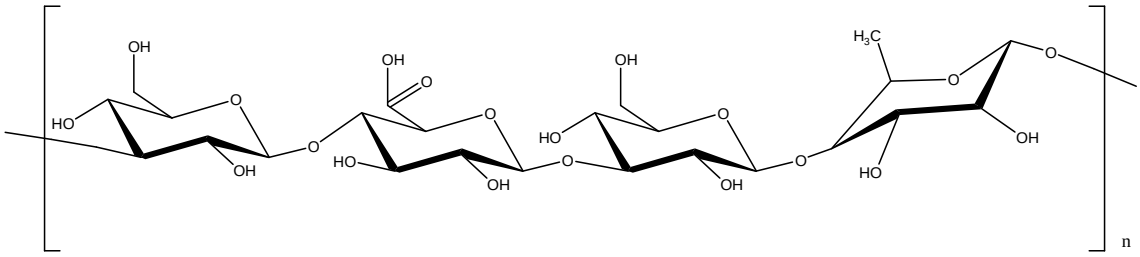

Figura 3: Estrutura química de um polímero de gelana.

3.2.4. Xantana

Dentre os polissacarídeos bacterianos, a xantana, produzida pelo cultivo da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* é a goma mais utilizada comercialmente, com uma produção mundial de cerca de 50.000 (2006) toneladas por ano, sendo que cerca de 65% deste montante é utilizado na indústria de alimentos. Em diversos países é a única goma bacteriana a possuir autorização para ser utilizada na indústria alimentícia (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; CRUZ PRADELLA, 2006; BORGES; BASTOS; VENDRUSCOLO, 2007; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009).

A xantana é um heteropolissacarídeo constituído por unidades de glucose, manose e ácido glucurônico na proporção de 2:2:1 (Figura 4), com pequenas quantidades de *O*-acetil e resíduos de piruvato. A cadeia principal do polímero é formada por dímeros de unidades D-glucopiranosídicas β(1→4) ligadas, sendo uma das unidades 3-*O*-substituída pelo trissacarídeo α-D-manopiranose β(1→3); ácido glucurônico β(1→2) e β-D-manopiranose(1→4). A unidade terminal não redutora da ramificação pode ser *O*-substituída em 4 e 6 por um grupo piruvato enquanto a manose, ligada a cadeia principal, pode apresentar-se acetilada em *O*-6. Os teores destes substituintes podem variar de 30 a 40% para o piruvato e de 60 a 70% para a acetila, entre as gomas produzidas pelas diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* (COVIELLO, 2007). Os substituintes, presentes na ramificação, influenciam diretamente na formação e estabilização de uma estrutura espacial ordenada e,

consequentemente, na viscosidade (KUMAR, MODY e JHA, 2007); a massa molecular pode variar de 2 a 12 x 10^6 Da (ROLLER; DEA, 1992; KATZBAUER, 1998).

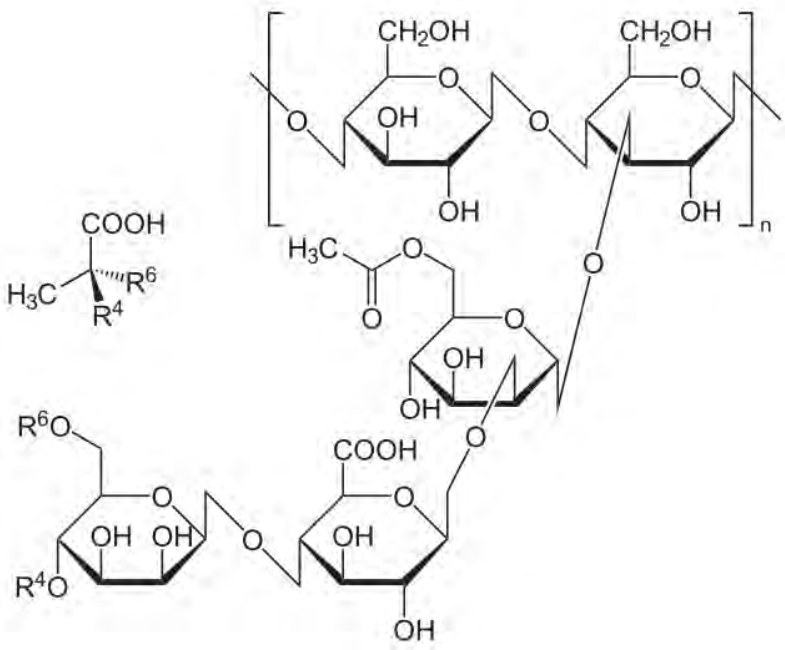

Figura 4: Estrutura da unidade pentassacarídica repetitiva da xantana.

A solução aquosa de xantana é estável, viscosa, apresentando características pseudoplásticas com capacidade para formar géis mesmo em baixas concentrações, estável em ampla faixa de pH, temperatura e na presença de sais (KIM; TAKEMASA; NISHINARI, 2006). Além destas propriedades, a goma xantana pode interagir de modo sinergístico com galactomananas, resultando em uma solução com maior viscosidade, mesmo à temperatura ambiente (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Empregada na indústria alimentícia, é utilizada no controle da viscosidade, textura, retenção de aromas, suspensão de sólidos e em emulsões, também pode ser utilizada no preparo de molhos prontos, alimentos congelados, suco de frutas e coquetéis e em sobremesas instantâneas (MAUGERI FILHO, 2001).

Além da indústria de alimentos, a goma xantana também encontra aplicações como agente de suspensão, espessante e quelante de metais pesados (KATZBAUER, 1998; KUMAR, MODY e JHA, 2007)

3.2.5 Outros exopolissacarídeos bacterianos em estudo

O exopolissacarídeo denominado Kefiran é produzido pela bactéria *Lactobacillus kefiranofaciens* que foi isolada de grânulos de kefir. Esse polímero é formado por unidades de glucose e galactose numa relação molar de 1,00:1,05. A unidade repetitiva é formada por uma cadeia principal de [→6)-β-D-Glc*p*-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*(1→4)-β-D-Glc*p*-(1→] com ramificação β-D-Glc*p*-(1→2) ligada a primeira galactose da unidade repetitiva. Testes de redução de colesterol foram realizados com este polímero e mostraram que grupos de ratos alimentados com kefiran apresentaram menores níveis de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides no sangue, quando comparados com o grupo controle, mostrando que ele pode ser usado como aditivo alimentar (MAEDA et al., 2004).

Algumas bactérias da espécie *Streptococcus thermophilus*, muito utilizadas em culturas mistas para a produção de iogurte, são produtoras de exopolissacarídeos por fermentação lática (DEGEEST; MOZZI; VUYST, 2002; FABER, et al., 2002; VUYST et al., 2003; PURWANDARI; SHAH; VASILJEVIC, 2007). O EPS produzido pelo *S. thermophilus* 8S e estudado por Faber e colaboradores (2002), foi caracterizado como um polímero linear constituído de galactose, glucose, ribose e *N*- acetil glucosamina na proporção de 3:2:1:1 formando uma unidade heptassacarídica, com o ácido perlagônico (ácido nonanóico, $C_9H_{18}O_2$), em ligação éster a uma das unidades de glucose da cadeia principal.

O *Streptococcus macedonicus* Sc136, uma bactéria lática gram positiva, é capaz de sintetizar um EPS com elevada massa molecular e grande capacidade de texturização, que foi caracterizado por Vincent e colaboradores (2001), utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa. O polímero constituído por glucose, galactose e *N*-acetil glucosamina, nas proporções de 3:2:1, mostrou-se com uma cadeia principal de [→4)-α-D-Glc*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*-(1→] substituída em *O*-3-Gal*p* por uma cadeia lateral de [β-D-Gal*f*-(1→6)-β-D-Glc*p*-β-D-Glc*p*NAc(1→] .

A bactéria marinha *Rhodococcus erythropolis*, conhecida pela capacidade de metabolizar diversos alcanos também é produtora de exopolissacarideos. Urai e colaboradores (2007) caracterizaram um EPS esterificado a um ácido graxo produzido pela estirpe PR4 como sendo um polímero linear constituído de galactose, glucose, manose e ácido glucurônico na proporção de 1:1:1:1, sendo as unidade de

glucose e manose unidas por ligações do tipo β(1→3) enquanto as demais ligações são do tipo β(1→4). Apresentam em sua estrutura ácidos esteárico – 2,9% (m/m) – e palmítico 4,3 % (m/m).

Kambourova e colaboradores (2009) estudaram a produção de EPS pela bactéria *Geobacillus tepidamans* V264 e o caracterizaram como sendo constituído por glucose, galactose, fucose e frutose unidas por ligações do tipo α na proporção de 1:0,07:0,04:0,02, respectivamente, contendo cerca de 0,2% de ácido urônico. A massa molecular encontrada foi superior a 1 x 10^6 Da, sendo determinada a partir de uma curva de calibração utilizando padrões de dextrana, como referência.

A estirpe 8-37-0-1 da bactéria *Bacillus licheniformis* é conhecida pela sua grande capacidade de produção de polissacarídeos, aproximadamente 47,0 g/L de meio de cultivo. Liu e colaboradores (2010) isolaram um novo tipo de EPS produzido por este microrganismo durante processos fermentativos e o caracterizaram como uma levana com ligações β-(2→6) na cadeia principal e uma ramificação de frutose β-(1→2) a cada sete unidades de frutose da cadeia principal, apresentando massa molecular de $2,8 \times 10^4$ Da.

3.3 EPS produzidos por bactérias do gênero Rhizobium

Dentre as bactérias gram-negativas produtoras de EPS, encontram-se as do gênero *Rhizobium e Mesorhizobium* que infectam as raízes de plantas leguminosas em uma relação simbiótica resultando na formação de nódulos nas raízes da planta, nos quais as bactérias produzem enzimas sensíveis ao oxigênio, denominadas nitrogenases, que promovem a conversão do nitrogênio molecular (N_2) atmosférico em íons amônio (NH_4^+), em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (F.B.N.), podendo ser utilizado como fonte de nitrogênio pela planta. Em contrapartida, a bactéria utiliza os carboidratos produzidos pela fotossíntese do organismo hospedeiro, como fonte de energia. (HER et al., 1989; WALLEY; STEPHENS, 2002; TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Estes microorganismos produzem grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares que atuam no processo de F.B.N. funcionando como marcadores biológicos que facilitam o processo de simbiose (BREEDVELD; MILLER, 1994; GONZÁLEZ; YORK; WALKER, 1996; YORK; WALKER, 1998; DATTA;

BASU, 1999). Na agricultura, os rizóbios mais importantes são aqueles que se associam com leguminosas (WALLEY; STEPHENS, 2002).

A família Rhizobiaceae, composta pelas bactérias dos gêneros *Rhizobium, Allorhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Bradyrhizobium* e *Azorhizobium,* é conhecida como produtora de diferentes exopolissacarídeos, desde simples glucanas até complexos heteropolímeros (WERNER; NEWTON; 2005). Vários EPS produzidos por diferentes linhagens de rizóbios já foram caracterizados estruturalmente. O *Rhizobium* sp. NGR234 sintetiza um EPS que foi caracterizado como uma succinoglicana com unidades repetitivas contendo galactose e glucose na proporção de 1:7 com ligações β(1→3), β(1→4) e β(1→6), contendo resíduos de succinil, acetil e piruvil e, com esta composição, foi denominado como exopolissacarídeo tipo 1 (EPS I). Este mesmo microorganismo sintetiza um outro exopolissacarídeo, denominado tipo 2 (EPS II), constituído por unidades repetitivas de glucose e galactose na proporção 1:1 unidos por ligações α(1→3) e β(1→3) contendo resíduos de acetil e piruvil (BECKER; PÜHLER, 1998). Acredita-se que os dois EPS estejam associados com a infecção das raízes de leguminosas (RIDOUT et al., 1997).

Dentre os polissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas (fixadoras de N_2) da família Rhizobiaceae, os mais estudados são de estirpes de *R. leguminosarum, R. etli, S. meliloti, B. japonicum* e *B. elkanii.* Exemplos de estruturas de alguns desses EPS são mostrados na tabela 1 (CARLSON et al., 1999).

A estrutura de um dos EPS produzidos pelo *Rhizobium japonicum* 71A foi elucidada por Dudman (1978), através de técnicas de metilação e RMN, como uma cadeia repetitiva constituída por um trímero de L-ramnose com uma ligação α-(1→3) para cada duas ligações β-(1→4). Unidades de ácido glucurônico 4-*O*-metilado estariam unidos por ligação β-(1→3) a alguns monômeros de α-L-ramnose, da cadeia principal.

Tabela 1: Exemplos de polissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas.

Espécie	Estrutura
R. leguminosarum	**Cadeia principal:** →4)-β-D-Glc*p* A-(1→4)-3-*O* -Ac-β-D-Glc*p* A-(1→4)-2-*O* -Ac-β-D-Glc*p* -(1→ **Ramificação:** 4,6-*O* -Pyr-β-D-Gal*p* -(1→3)-4,6-*O* -Pyr-β-D-Glc*p* -(1→4)-β-D-Glc*p* -(1→4) -β-D-Glc*p* -(1→6
S. melioti	EPS I **Cadeia principal:** → 4)-β-D-Glc*p* -(1→4)-6-*O* -Ac-β-D-Glc*p* A-(1→3)-β-D-Gal*p* -(1→4)-β-D-Glc*p* -(1→ **Ramificação:** 4,6-*O* -Pyr-β-D-Glc*p* -(1→3)-6 -*O* -Succ-β-D-Glc*p* -(1→3)-β-D-Glc*p* -(1→6) -β-D-Glc*p* -(1→6 EPS 2 → 3)-6-O-Ac-β-D-GlcpA-(1→3)-4,6°-Pyr-β-D-Galp-(1→
R. ssp. NGR 234	**Cadeia principal:** →6)-β-D-Glc*p* -(1→4)-β-D-Glc*p* -(1→4)-β-D-Glc*p* -(1→3)-β-D-Gal*p* -(1→4)-β-D-Glc*p* -(1→6)-β-D-Glc*p* -(1→ **Ramificação**: 3-*O* -Ac-4,6-Pyr-α-D-Gal*p* -(1→4)-α-D-Glc*p* -(1→3)-β-D-Glc*p* -(1→4
B. japonicum	**Cadeia principal:** →3-β-D-Glc*p* -(1→3)-α-Gal*p* A-(1→3)-α-D-Man*p* -(1→3)-α-Glc*p* -(1→ **Ramificação:** 4-*O* -Me-α-D-Gal*p* (1→6

Fonte: CARLSON et al., 1999.

Levery e colaboradores (1991) caracterizaram um dos polissacarídeos excretados pela estirpe Rm7011 *Rhizobium melioti* como sendo uma seqüência de [4,6-*O*-Pyr-β-Glc*p*(1→3)- β -Glc*p*(1→3)- β -Glc*p*(1→6)- β -Glc*p*(1→6)] →4)- β -Glc*p*(1→4) - β -Glc*p*(1→4) - β -Glc*p*(1→3) - β -Glc*p*(1→ através do uso combinado das técnicas de metilação, cromatografia gasosa e espectrometria de massa para determinação dos monossacarídeos constituintes e posições das ligações. A determinação da configuração anomérica, bem como a confirmação dos resultados obtidos pelas demais análises foram efetuadas com o uso de técnicas de RMN uni e bidimensionais.

Simsek e colaboradores (2009) estudaram as propriedades químicas e reológicas de diferentes exopolissacarideos produzidos por quatro estirpes de *Sinorhizobium melioti*, NRG185, NRG247, NRG34 e Rm41. Através de análises de HPSEC e RMN concluíram que a massa molecular e a natureza da substituição das succinoglucanas podem variar para cada estirpe. As quatro cepas foram capazes de produzir succinoglucanas com diferentes graus de substituição e distribuições de massa molecular.

Nem todos os gêneros de *Rhizobium* produzem os dois tipos de polímeros. Pesquisas realizadas com *R. meliloti* e *Agrobacterium* sp indicam que essas produzem apenas moléculas do tipo I (succinoglucana), com uma cadeia principal semelhante à encontrada em EPS produzidos por outros microrganismos da família Rhizobeaceae, contendo resíduos de glucose e galactose (HISAMATSU et al., 1980). Linhagens de *Rhizobium leguminosarium* produziram polissacarídeos do tipo II, com cadeia principal formada de resíduos de glucose e ácido glucurônico (AMEMURA; HARADA 1983).

Algumas espécies de bactérias da família *Rhizobiaceae* produzem também glucanas β (1→2) cíclicas, exclusivas desta família, que estão associadas ao papel de adaptação destes microorganismos durante o processo de infecção na raiz da planta hospedeira (BREEDVELD; MILLER, 1994).

Como mostrado nesta revisão há diferenças estruturais que certamente justificam os diferentes comportamentos e propriedades físico-químicas das soluções polissacarídicas. Portanto, a caracterização química dos polímeros é fundamental para se entender as diferenças apresentadas por suas soluções.

3.4 Caracterização química estrutural de polissacarídeos

A estrutura química determina as características físico-químicas e reológicas apresentadas pelos polissacarídeos. Portanto a determinação da estrutura química destes polímeros é o primeiro passo para a compreensão destas propriedades e suas aplicações (GARESH, et al., 2002, TONELI, MURR, PARK, 2005), mesmo assim são poucas as informações estruturais disponíveis na literatura sobre os diversos tipos de EPS bacterianos (KAMBOUROVA et al., 2009). Para um EPS ser caracterizado quimicamente, é necessário primeiro, verificar a sua pureza. Uma vez considerado a ausência de contaminantes, a caracterização química se obtém pela determinação da massa molecular, identificação da composição em monossacarídeos, configuração e a posição da ligação glicosídica, bem como a sequência dos monossacarídeos ao longo do polímero, este ultimo, um processo complexo, para heteropolímeros (LAWS; GU; MARSHALL, 2001).

Alguns métodos podem ser utilizados para a determinação da massa molecular de um polímero. Entre eles encontra-se a cromatografia de gel permeação com detector de índice de refração ou HPSEC/RID (High Perfomance Size Exclusion Chromatography – Refractive Index Detection). Para a determinação da massa molecular por HPSEC é necessário que um “pool” de padrões de polímeros, da mesma classe química do material em estudo, esteja disponível para a análise. A partir da construção de uma curva de calibração fornecida pelo logaritmo da massa molecular de cada padrão x tempo de eluição de cada padrão, é possível chegar à massa molecular aparente do material em estudo. Como muitos EPS formam grandes complexos moleculares com massas elevadas, excedendo os limites de exclusão das colunas, a utilização combinada dos detectores de IR com espalhamento de luz proporciona uma massa molecular média mais precisa (LAWS; GU; MARSHALL, 2001).

Os polissacarídeos são constituídos por inúmeros resíduos de iguais ou diferentes tipos de monômeros interligados um ao outro, em diferentes posições, por ligações glicosídicas do tipo α e/ou β, que podem influenciar consideravelmente na velocidade e eficiência da hidrólise ácida. Os procedimentos empregados para a determinação destes constituintes incluem hidrólise ácida, metilação seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS), análises por espectroscopia no infravermelho acoplado por transformada de Fourier (FT-IR) e ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono 13 (^{13}C) e de prótons (^{1}H)

(SCAMPARINI et al., 2000; LAWS; GU; MARSHALL, 2001; GONZAGA *et al*., 2005).

3.4.1. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida total é o primeiro passo para determinar a composição em monossacarídeos do polímero e consiste na quebra de todas as ligações glicosídicas que unem os monômeros, sem degradá-los. Entretanto, algumas ligações glicosídicas são mais susceptíveis ao ataque ácido do que outras. Por exemplo, ligações envolvendo anéis furanosídicos e deoxiaçúcares são geralmente menos resistentes e podem ser facilmente hidrolisadas por ácido, a hidrólise de um deoxiaçúcar é cerca de cinco vezes mais rápida que o seu correspondente hidroxilado. De modo análogo, a presença de grupos ácidos como o ácido urônico pode dificultar a hidrólise do monômero em que está ligado. Deste modo é muito importante o estudo da cinética de hidrólise ácida para cada polissacarídeo, considerando-se o tipo de ácido, diferentes concentrações do catalisador e tempo de reação (PAZUR, 1994; CUI, 2005).

Muitos ácidos podem ser usados na hidrólise das ligações glicosídicas, entre eles ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e trifluoracético (CF_3CO_2H), sempre associados a temperaturas elevadas. O HCl utilizado na hidrólise de β glucanas, apresenta bons resultados para polissacarídeos solúveis em água, como a maioria das gomas. Para polissacarídeos insolúveis em água o H_2SO_4 é mais utilizado devido à possibilidade de ser empregado em uma maior concentração, quando comparado com o HCl, proporcionando a solubilização destes materiais em meio ácido, entretanto é de difícil remoção necessitando de neutralização e da adição de resinas para eliminação de cátions e ânions gerados na reação (JOHANSSON et al., 2005).

O TFA (ácido trifluoroacético) é excelente para hidrólise de polissacarídeos solúveis em água; é geralmente preferido devido a sua volatilidade e, consequentemente, fácil remoção por evaporação a baixa pressão (PAZUR, 1994; JOHANSSON et al., 2005).

3.4.2. Metilação

A metilação é uma derivatização química muito utilizada na caracterização de polissacarídeos. Apesar de empregada há mais de um século ainda é o

método mais utilizado para determinar a posição das ligações glicosídicas, presentes na estrutura do polímero. Esta análise se resume em substituir todos os hidrogênios de hidroxilas livres por grupos metílicos. O polissacarídeo totalmente metilado é submetido à hidrólise ácida para rompimento das ligações glicosídicas. Os hidrolisados são, então, reduzidos para obtenção de alditóis parcialmente metilados e, em seguida, acetilados para obtenção de acetatos de alditóis parcialmente metilados (Figura 5), compostos voláteis que podem ser analisados por CG-MS. As posições dos grupos acetil presentes na molécula - excluindo-se aquele do carbono 5 (que é responsável pelo ciclização do monossacarídeos quando na forma piranosídica) - corresponderão aos carbonos envolvidos nas ligações glicosídicas do polímero original (JANSSON et al., 1976; PAZUR, 1994; CUI 2005).

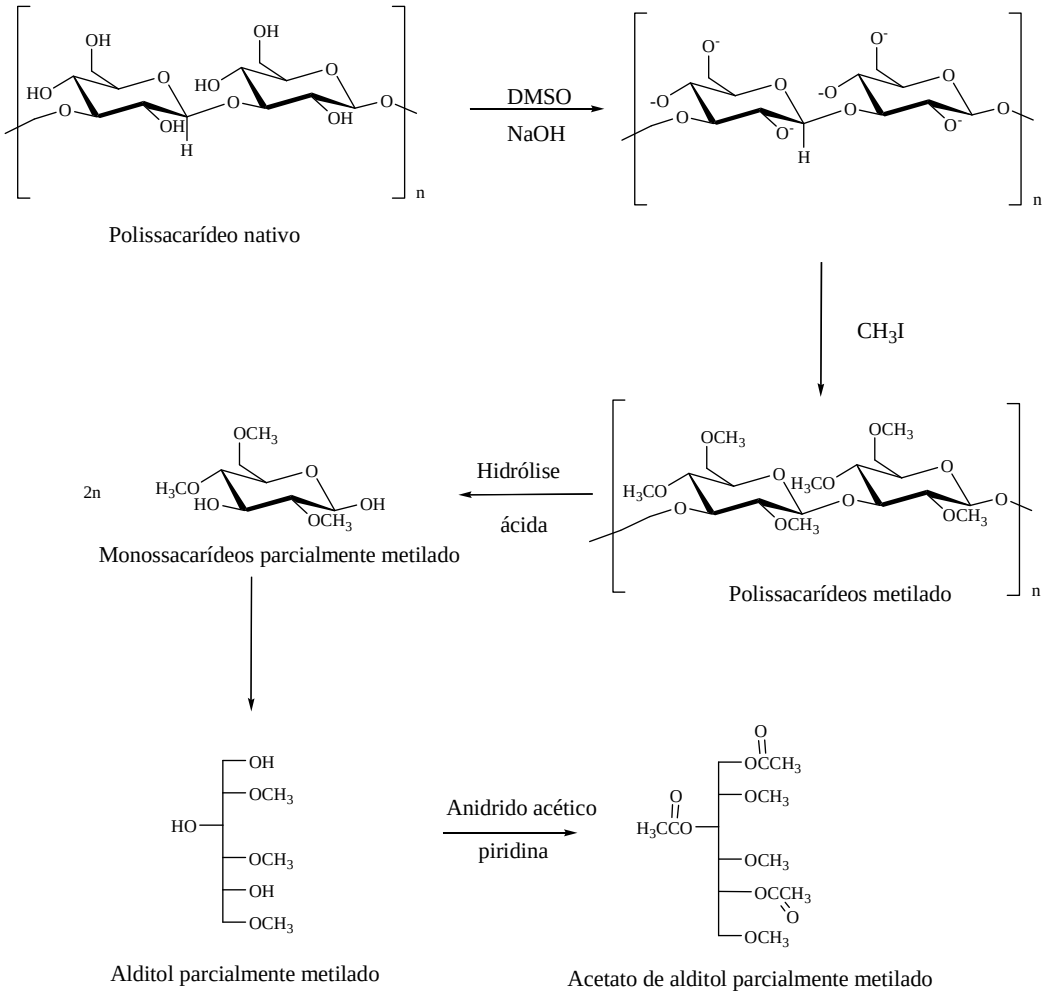

Figura 5: Esquema mostrando a seqüência de reações para obtenção de acetatos de alditóis parcialmente metilados, a partir de um polissacarídeo nativo (a metilação segue o procedimento de Ciucanu e Kerek)

O procedimento químico de metilação, apesar de eficiente para homopolímeros, principalmente se pouco ramificados, pode torna-se ineficaz para heteropolímeros ramificados e substituídos, provavelmente porque os substituintes ocupam posições que dificultam, por impedimento estérico, a entrada dos grupos metilas.

A metilação pode ser realizada por diferentes métodos, entretanto todos apresentam em comum um ambiente de elevada alcalinidade para a formação de íons alcóxidos e de um composto fornecedor de grupos metilas (CUI 2005).

Dentre os métodos existentes, os mais citados são os de Haworth (1915), que consiste na solubilização do material em uma solução de NaOH 40% (m/v) e o uso de DMS (sulfato de dimetila) como composto doador de grupo metila; o método de Ciucanu (CIUCANU; KEREK, 1984) onde o analito a ser metilado é solubilizado em DMSO (Dimetil sulfóxido), adicionada uma base forte, geralmente NaOH ou KOH, que remove os prótons das hidroxilas do carboidrato e o iodeto de metila (CH_3I) como grupo doador de metila. A seleção de um dos dois métodos deve-se, basicamente, a solubilidade do material a ser metilado, se em água ou em DMSO.

Para análise dos derivados metilados a cromatografia gasosa é o método de eleição.

3.4.3. Métodos cromatográficos

A cromatografia é um método de separação que se baseia nas propriedades físico-químicas e interações de duas ou mais substâncias. A separação ocorre devido à diferente interação entre duas fases imiscíveis denominadas de móvel e estacionária. Esta técnica pode ser utilizada para identificar compostos desconhecidos, sempre comparando com padrões específicos e, também, para a purificação de substâncias. Pode ser classificada em cromatografia planar, onde se encontram as cromatografias de papel e camada delgada; cromatografia em coluna, que pode ser líquida a pressão ambiente, a alta pressão ou ainda a gás. (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

A cromatografia líquida de alta pressão utiliza colunas muito eficientes na separação e bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, que deve ser isenta de gases reativos, como o oxigênio, e ser preparada com reagentes de alto grau de pureza.

As colunas utilizadas são constituídas de aço inoxidável com diâmetro interno de 0,45 cm e 2,2 cm para separações analíticas e preparativas, respectivamente, com comprimento variando entre 10 a 30 cm. A separação pode ser por adsorção ou partição, conforme a fase estacionária utilizada, que pode variar desde sílica tratada até géis eletricamente carregados.

Os sistemas de HPLC (high-pressure liquid chromatography) são equipados com detectores que variam conforme a substância a ser separada, sendo os mais comuns de ultravioleta, fluorescência, índice de refração, eletroquímico e de polarimetria. (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

Na caracterização de carboidratos a cromatografia líquida de íons de alta pressão associada ao detector de amperometria pulsada (HPAEC/PAD) é utilizada para analisar os monômeros obtidos a partir da hidrólise ácida total de oligo- e polissacarídeos. (VASCONCELOS et al., 2008; FUKUDA et al., 2009). Este sistema também é eficiente para separação de oligo- e polissacarídeos com grau de polimerização de até 40 unidades monoméricas.

Outro sistema bastante utilizado é a cromatografia gasosa (GC), na qual o princípio de separação está na partição dos componentes da amostra entre a fase estacionária presa na coluna e o gás de arraste. Esta técnica possui elevado poder de resolução que permite detectar amostras em escala de nano a pico grama (10^{-9} a 10^{-12} g). Devido a esta alta resolução os gases de arraste devem ter elevado grau de pureza. Esta técnica apresenta uma limitação que é a necessidade do analito ser volátil ou poder ser transformado quimicamente em um composto volátil, para ser carregado pelo gás de arraste.

Uma das maiores diferenças entre as colunas da GC e da HPLC é o comprimento das colunas do primeiro sistema, que pode chegar a dezenas de metros com o diâmetro variando de 0,15 a 0,75 mm. Os detectores usados são de ionização de chama, condutividade térmica ou, ainda, estar acoplado a um espectrômetro de massa (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998). Para açúcares, os derivados metilados e parcialmente metilados, são sempre analisados por cromatografia gasosa.

3.4.4. Espectrometria no infravermelho

Na última década, a espectroscopia no infravermelho tem emergido como uma ferramenta importante para auxiliar na determinação da configuração e no tipo de ligação glicosídica dos polissacarídeos, na presença de substituintes como grupos acetil e acido urônico, bem como detectar possíveis contaminações ou ainda a presença de glicoconjugados (KACURÁCOVÁ et al., 2002; WOLKERS et al. 2004; CORRADI DA SILVA et al., 2005). Esta técnica detecta variações nos estados de energia vibracional das ligações que compõem uma determinada molécula, associadas aos movimentos de torção, rotação e vibração (KACURÁCOVÁ et al., 2002; WOLKERS et al., 2004).

O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, porém certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma freqüência, o que possibilita identificar estes grupos de átomos (ŠANDULA et al., 1999). Como exemplo, a carbonila de ácidos carboxílicos que, quando presentes na molécula, provoca o aparecimento de uma banda na região de 1750 cm^{-1} (FRINGANT; DESBRIÈRES; RINAUDO, 1996).

No FT-IR a molécula é exposta a um feixe de radiação infravermelho. Cada ligação que constitui a molécula irá absorver parte dessa energia promovendo sua vibração. Considerando-se que as freqüências vibracionais são específicas para cada grupo funcional e são sensíveis ao ambiente molecular, conformação e características das cadeias, a espectroscopia torna-se um método eficiente para análises preliminares de biopolímeros (CAMPBELL E WHITE, 1989).

A determinação da estrutura de uma molécula orgânica a partir de um espectro de FT-IR baseia-se na observação de sinais presentes na região de freqüências de grupos, compreendida para compostos orgânicos, entre 3600 a 1200 cm^{-1}, nesta região são encontrados sinais que estão associados a cada grupo funcional. A análise da região de freqüências de grupo, auxiliada por uma tabela de correlação, permite fazer estimativas dos grupos presentes e ausentes na molécula em estudo (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Uma segunda etapa nas análises de FT-IR consiste na comparação da região compreendida entre 1200 e 600 cm^{-1}, denominada região de impressão digital. Levando-se em consideração que cada ligação presente na molécula não está isolada das demais é natural que ocorra uma pequena interferência entre grupos vizinhos, resultando

em pequenas distorções vibracionais que são registradas nesta região, formando uma combinação que depende exclusivamente da estrutura da molécula, é essa complexidade que proporciona perfis únicos nesta região (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Nos polissacarídeos a ligação éter que une os monossacarídeos (ligação glicosídica), pode estar presente na molécula de dois modos espacialmente diferentes, α e/ou β, que geram igualmente bandas próximas a 1250 cm^{-1}, porém sinais diferentes na região de impressão digital, 850 e 890 cm^{-1}, para α e β, respectivamente (ZHBANKOV; ANDRIANOVA; MARCHEWKAB, 1997; MOHAČEK-GROŠEV; BOŽAC; PIPPELS, 2001; SYNYTSYA et al., 2003; ZHAO et al., 2005; CAO et al., 2006; ZHAO et al., 2006; HE et al., 2007; CORRADI DA SILVA et al., 2008).

Apesar das informações obtidas com os espectros de FT-IR para elucidar a estrutura química dos carboidratos, o método espectroscópico mais empregado para o estudo dessas moléculas é o ressonância magnética nuclear (GORIN; MAZUREK; SPENCER, 1968, GORIN, SPENCER, 1970; GORIN, 1983, RUTHES et al, 2010).

3.4.5 Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode ser usada para o estudo das propriedades físicas, químicas e biológicas de diversos compostos. Ela é um fenômeno que ocorre quando o núcleo de certos átomos é colocado em um campo magnético definido, promovendo o alinhamento do momento angular do núcleo a favor ou contra o sentido do campo originando, respectivamente, núcleos com spin α e β, como mostrado na figura 6. Este fenômeno foi inicialmente estudado pelos físico-químicos, ganhadores do premio Nobel de Física de 1952, Edward Mills Purcell e Felix Bloch (KAISER, 1999; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; BRUICE, 2006) e aplicado ao estudo de estruturas de carboidratos por Gorin e Mazurek a partir de 1963.

Um núcleo com spin α, de menor energia, pode ser promovido a spin β, de maior energia, ao receber uma energia quantizada (ΔE). Quando estes núcleos retornam ao seu estado natural é liberada uma quantidade de energia eletromagnética proporcional a ΔE recebida e é nessas emissões que se baseia a espectroscopia de RMN. A energia necessária para promover o núcleo de spin α para β é diferente para cada ambiente químico que o envolve, sendo possível detectar núcleos de um mesmo

elemento em diferentes ambientes químicos. (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; BRUICE, 2006).

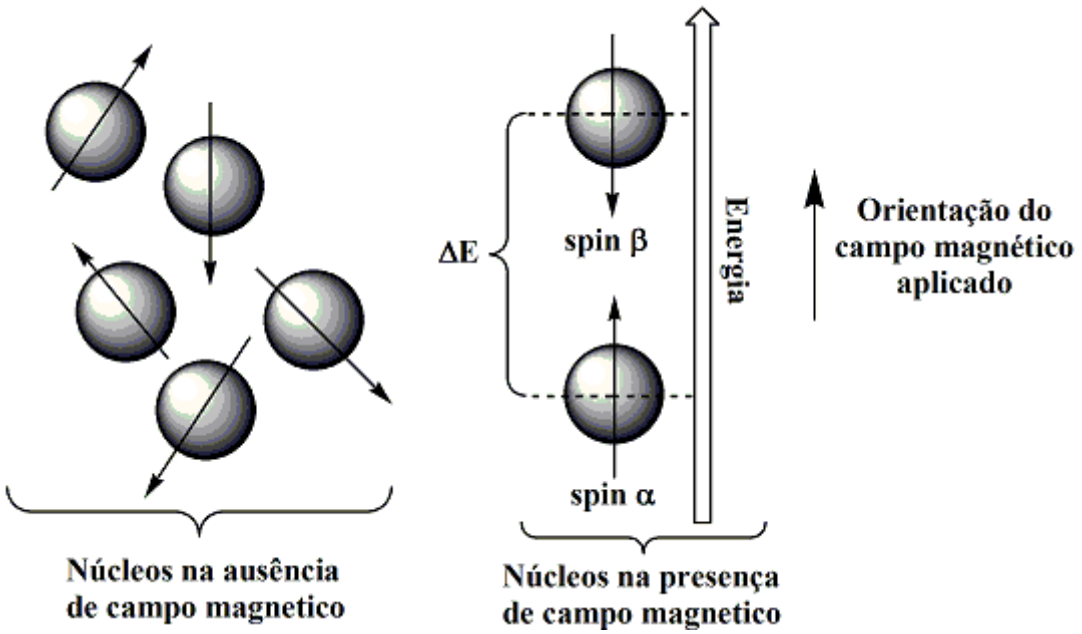

Figura 6: Representação esquemática dos núcleos de átomos na ausência e presença de campo magnético. (Adaptado de BRUICE, 2006)

O efeito da blindagem do núcleo pelo ambiente químico no qual ele está inserido é medido como deslocamento químico (δ). É uma medida relativa e adimensional que tem como ponto de partida o ΔE dos átomos de um composto de referência que apresenta apenas um ambiente químico para o próton e outro para o carbono-13. Para medidas efetuadas em baixas temperaturas o composto de referência é o tetrametilsilano (TMS, figura 7-a) e para aquelas realizadas em temperaturas elevadas é o hexametildisiloxano (HMDS, figura 7-b). Os valores de δ são calculados pela diferença de energia eletromagnética entre a amostra e o padrão sobre a freqüência aplicada. Esta divisão resulta em um valor adimensional (Hz/Hz) e muito pequeno, apresentando-se como parte por milhão (ppm), para facilitar a manipulação dos dados (BECKER, 2000; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; BRUICE, 2006). Conhecendo-se quanto um núcleo se desloca para campo baixo (da direita para a esquerda), devido a efeitos de blindagem de grupos próximos a este núcleo, é possível, através de informações disponibilizadas na literatura, identificar o grupo responsável pelo deslocamento do núcleo para aquele determinado deslocamento (BECKER, 2000; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; BRUICE, 2006).

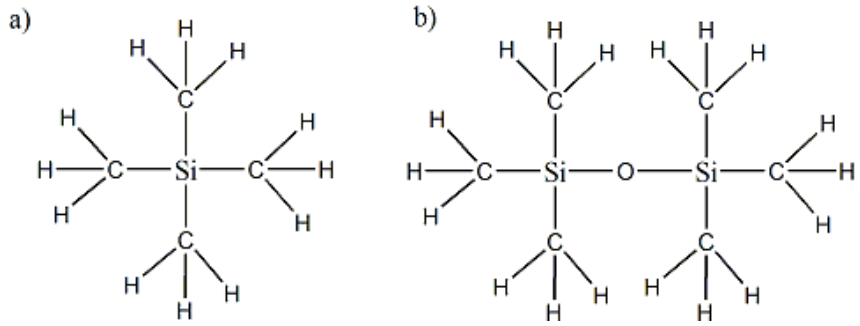

Figura 7: Estruturas químicas dos compostos a) TMS e b) HMDS

Mesmo atuando como uma poderosa ferramenta, a RMN unidimensional possui limitações para estudos de estruturas de compostos mais complexos como proteínas e polissacarídeos, devido ao acúmulo de sinais dificultando sua correta atribuição e o grande número de acoplamentos (*J*) existentes nas moléculas. Como alternativa foram desenvolvidas as técnicas de RMN bidimensionais (RMN-2D), que apresentam vantagens como a distribuição dos inúmeros sinais do espectro de ressonância em um plano 2D e a oportunidade de correlacionar os pares de ressonâncias. Muitas técnicas de RMN-2D têm sido propostas na literatura, mas a maioria destes experimentos pode ser considerada como variações de um número bastante pequeno de abordagens básicas (BRUICE, 2006).

As análises de RMN-2D baseadas na ressonância de um único núcleo (homonuclear) são denominadas espectroscopia de correlação (COSY - COrrelation SpectroscopY) e aquelas nas quais há interação de dois núcleos (heteronuclear) são chamadas de correlação heteronuclear (HETCOR – HETeronuclear CORrelation) (KAISER, 1999; BECKER, 2000).

As análises de COSY são efetuadas pela aplicação de uma sequência de pulsos magnéticos, a 90º, em diferentes tempos (*t1*), produzindo uma única linha de ressonância com a mesma frequência em ambos os tempos (*t2*), que se apresenta como uma única reta na diagonal principal do espectro 2D. Porém, se a magnetização dos spins for transferida de um para outro spin, com uma freqüência de ressonância diferente, haverá picos fora da diagonal, indicando acoplamento. Os picos fora da diagonal mostram padrões de acoplamento entre os prótons (BECKER, 2000).

As possíveis ligações de prótons estão limitados a 4, no máximo, e dão informações sobre sua estrutura. Entretanto, outros dados importantes podem ser

obtidos por interações de maior alcance, para isso pode-se usar outra técnica de RMN-2D denominada espectroscopia de correlação total (TOCSY – TOtal Correlation SpectroscopY) onde observa-se, de modo análogo aos espectros de COSY, as correlações entre um determinado próton e os demais prótons próximos a ele (KAISER, 1999).

As análises HETCOR são realizadas de modo similar às de COSY e são usadas para determinar a correlação existente entre os átomos de carbono e hidrogênio, através dos acoplamentos destes dois átomos (J_{CH}). O experimento é conduzido com diversas seqüências de pulsos magnéticos. O primeiro pulso excita núcleos de prótons, cujo deslocamento químico é detectado durante o período de evolução *t1*; o último pulso de magnetização é transferido para os núcleos do carbono, cuja intensidade será modulada pelo deslocamento químico do próton. Nesta técnica, é possível identificar todos os átomos de carbono, caso os prótons já tenham sido atribuídos pela análise do espectro de RMN-^{1}H. Da mesma forma todos os prótons poderão ser identificados caso os deslocamentos químicos dos átomos de carbono tenham sido atribuídos na RMN-^{13}C (KAISER, 1999).

Obter espectros de RMN diretamente de átomos pouco sensíveis, como o carbono, em amostras diluídas é muito difícil, como ocorre nos experimentos de RMN-1D. Para resolver este problema de resolução, foram criadas técnicas de RMN-2D que utilizam pulsos onde a detecção é feita de modo indireto, usando os canais de átomos mais sensíveis, como o de prótons por exemplo. Sequências de pulsos envolvendo transições multiplo-quânticas são denominadas de coerência multiquântica heterenoclear (HMQC - Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) e coerência multi vínculo heteronuclear (HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Coherence). Os espectros HMQC e HMBC são plotados com δ do próton no eixo horizontal e δ do carbono no eixo vertical (KAISER, 1999).

A caracterização química dos carboidratos é cada vez mais efetuada com os resultados obtidos das análises espectroscópicas da ressonância magnética nuclear de carbono e próton, uni e bidimensionais. Está técnica tem, sobre as demais, a vantagem adicional de não promover nenhum tipo de degradação no material estudado, oferecendo a oportunidade de reutilização do mesmo. Ye e colaboradores (2009) determinaram a estrutura de um heteropolissacarídeo utilizando apenas espectros uni- e bidimensionais de RMN como HMQC, COSY e TOCSY, mostrando assim o potencial da técnica para a caracterização de compostos complexos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1. Obtenção do exopolissacarídeo

Os EPS estudados neste trabalho foram fornecidos pela Profª Drª Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, do departamento de tecnologia da faculdade de ciências agrárias e veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal, produzidos por três diferentes estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium*. A bactéria *Rhizobium tropici* foi submetida a duas condições de cultivos distintas, gerando dois exopolissacarídeos denominados R_1 e R_2. O EPS R_3 foi produzido a partir de uma linhagem denominada *Mesorhizobium* e o EPS R4 a partir de *Rhizobium* sp. As condições de cultivo não são descritas pois estão sob patente (PI0304053-4).

4.1.2. Reagentes

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

4.1.3. Equipamentos

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

Espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-VIS 1601

Cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) SHIMADZU, equipado com um detector de índice de refração diferencial SHIMADZU modelo RID 10A .

Sistema de eletroforese HOEFER® mini VE PHARMACIA BIOTECH

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo dos exopolissacarídeos

Após o recebimento, estes polímeros que se encontravam secos e triturados, foram solubilizados em água, dialisados em tubos de diálises com limites de exclusão molecular de 12000 Da, contra água destilada, por 72 horas para eliminação de possíveis resquícios do meio de cultivo e da fonte de carbono. Após a diálise, seus volumes foram reduzido em evaporador rotativo a baixa pressão e então congelados e liofilizados. Foram mantidos em congelador até o momento do uso para evitar qualquer espécie de degradação.

O processo de solubilização dos EPS foi realizado pela alternância de agitação mecânica, aquecimento controlado (35 ºC) e, quando necessário, ultrassom.

4.2.2. 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 em cada uma das soluções dos quatro EPS. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H_2SO_4 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), H_2SO_4 concentrado.

Procedimento: foram adicionados 0,5 mL da solução de fenol a 0,5 mL da amostra seguido da adição de 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado em um único jato. Após 10 minutos em repouso, a leitura foi realizada em um colorímetro da marca Micronal a 480 nm.

Para calcular a concentração de carboidratos, uma curva padrão de glucose (1mg/mL) com faixa de linearidade de 5 a 50 μg/500 μL foi realizada. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.2.3. 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-alcalino de Somogyi formando óxido cuproso, que na presença

do reativo arseno-molíbdico de Nelson forma um complexo de óxido de molibdênio de cor azul estável.

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

Procedimento: a 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 solvente e levados ao aquecimento, em banho fervente, por 10 minutos. Após este período os tubos foram resfriados e adicionado 0,5 mL do reagente de Nelson, seguido de 3,5 mL de água destilada. Os tubos foram agitados e lidos em espectrofotômetro Shimadzu a 540 nm.

Para calcular a concentração de açúcares redutores nas amostras foi usada uma curva padrão de glucose na concentração de 1mg/mL. A curva de calibração foi desenvolvida na faixa de linearidade de 10 a 100 μg/500 μL, de acordo com a estimativa do teor de carboidratos da amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4. 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: 40 mg de Coomassie Blue G-250 foram dissolvidos em 20 mL de etanol absoluto e adicionados 40 mL de acido fosfórico 85% e água destilada para completar 100 mL de solução.

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

Procedimento: 1 mL da solução diluída do corante foi adicionado a 100 μL da amostra e em seguida sua absorbância foi medida em espectrofotômetro Shimadzu a 595 nm.

A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de calibração com albumina bovina (BSA) com concentração de 1mg/mL, na faixa de linearidade de 10 a 50 μg/100 μL. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.5. Determinação de ácidos urônicos - método de Blumenkrants modificado

A dosagem de ácido urônico foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

Procedimento: em 400 μL de amostra (400 μg/mL) foram adicionados 40 μL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio 75 mM, em H_2SO_4 concentrado. Após aquecimento em banho com H_2O fervente por 20 min, os tubos foram resfriados e então adicionados 80 μL da solução de m-hidroxi-bifenil a 0,15% (m/v) em NaOH 0,5% (m/v) para a produção do complexo colorido. A absorbância da solução, estável até 1 hora após sua formação, foi medida imediatamente em 525 nm em espectrofotômetro Shimadzu.

A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido glucurônico na concentração de 0,1mg/mL dentro da faixa de linearidade do método (0,97 a 38,8 μg/400 μL de ácido urônico). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.6. Determinação do teor de piruvato

O teor de piruvato foi determinado pelo método descrito por Sloneker e Orentas (1962).

Procedimento: foram dissolvidos 10 mg da amostra liofilizada em 2,5 mL de água destilada e adicionados 2 mL de HCl 1M, em seguida as soluções foram transferidas para tubos de hidrólise e levadas a estufa, pré aquecida, a 100 °C por 3 horas. Após este período, os hidrolisados foram resfriados e então adicionados 2 mL de uma solução a 0,5% (m/v) de 2,4 dinitrofenil-hidrazina em HCl 2M e homogeneizados por 5 minutos. Na mistura se formou um sal de hidrazona que foi extraído com 4 mL de acetato de etila e lavado com 3 porções de 4 mL de uma solução de carbonato de sódio 10% (m/v). Foi efetuada a leitura em espectrofotômetro Shimadzu a 375 nm, utilizando como branco a solução de carbonato de sódio 10% (m/v).

A concentração de piruvato foi calculada através de uma curva de calibração com padrão de ácido pirúvico, dentro da faixa de linearidade do método (5 a 100 μg/2,5mL de ácido pirúvico). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.7. Determinação do teor de acetila

O teor de acetila foi determinado pelo método de Hestrin (1949).

Reagentes: Soluções de cloreto de hidroxilamônio 2M, hidróxido de sódio 3,5M, ácido clorídrico 4,1M e cloreto de ferro III 0,37M em ácido clorídrico 0,1M.

Procedimento: em 1,0 mL (400 µg/1mL) da amostra foram adicionados 2 mL de uma mistura 1:1 das soluções de cloreto de hidroxilamônio 2M e hidróxido de sódio 3,5M e homogeneizado, seguido da adição de 1,0 mL da solução de ácido clorídrico 4,1M e 1,0 mL da solução cloreto de ferro III 0,37 M formando assim um complexo colorido que foi lido em espectrofotômetro Shimadzu, em 540 nm.

A concentração de acetil foi calculada através de uma curva de calibração com padrão cloreto de acetilcolina (1mg/mL), dentro da faixa de linearidade do método (5 a 50 µg/mL de acetil). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.8. 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: foram realizadas diferentes condições de hidrólise para determinar a melhor condição para a obtenção dos monossacarídeos constituintes de cada EPS.

Condição 1: 300 µL de TFA 4M foram adicionados à amostra liofilizada. Após solubilização, os tubos contendo as amostras foram selados e aquecidos a 100°C por 4 horas.

Condição 2: 300 µL de TFA 5M foram adicionados à amostra liofilizada. Após solubilização, os tubos contendo as amostras foram selados e aquecidos a 100°C por 12 horas.

Condição 3: 300 µL de TFA 2M foram adicionados à amostra liofilizada. Após solubilização, os tubos contendo as amostras foram selados e aquecidos a 121°C por 2 horas.

Após a hidrólise, o ácido foi removido por evaporação a baixa pressão, com consecutivas trocas de H_2O deionizada. Em seguida, o material foi solubilizado em

500 µL de H_2O deionizada e analisado por cromatografia líquida de íons, em alta pressão (HPAEC).

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

Para análise dos monossacarídeos, obtidos na hidrólise ácida total dos polissacarídeos, foi utilizado um sistema Dionex DX500 (cromatografia líquida de íons) e um detector de amperometria pulsada (PAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros 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 93% de H_2O deionizada (eluente 1) e 7% NaOH 200 mM (eluente 2), resultando em um fase móvel com NaOH 14 mM, com corridas de 25 minutos.

A coluna foi regenerada por 10 minutos, após o término da corrida, com 100% do eluente 2 e, em seguida, submetida às condições iniciais (93% do eluente 1 e 7% do eluente 2) da análise por um período de 15 minutos (para equilibrar a coluna) antes da injeção da amostra.

Procedimento: 25 µL da solução em estudo, contendo 1 µg de açúcares totais, foram injetados no cromatógrafo líquido

Padrões: utilizou-se 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.

4.2.10. Análise das Ligações Glicosídicas dos Polissacarídeos

4.2.10.1. Metilação dos EPS pelo método de Ciucanu e Kerek (1984)

Dez (10) mg de cada EPS foram dissolvidos separadamente em 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), foi utilizada agitação magnética alternada com banho em ultrassom para assegurar total solubilização. Foram adicionados 20,0 mg de hidróxido de sódio (na forma de micro pérolas, previamente pesado e guardado até o momento de uso em dissecador) à cada amostra. Foi mantida agitação vigorosa por mais 15 minutos em agitador de tubos, e então foi adicionado 1 mL de iodeto de metila, seguido de mais

30 minutos de agitação vigorosa e então deixado “overnight” em ambiente isolado de luz e, no dia seguinte a reação foi interrompida com a adição de gelo picado.

Os materiais metilados foram transferidos para frascos de diálise com limite de exclusão de 12000 MWCO e mantidos em diálise conta água corrente por 48 horas e em água destilada por mais 24 horas. O material dializado foi então congelado e liofilizado. O procedimento de metilação foi repetido 3 vezes. Após a segunda e terceira metilação foram separadas alíquotas (correspondente a 1,0 mg) para acompanhar a substituição dos grupos hidroxila por grupos metila usando FT-IR.

4.2.10.2. Hidrólise e redução química

Os polissacarídeos completamente metilados foram submetidos à hidrólise, acrescentando 0,5 mL de ácido sulfúrico a 50% (v/v), em banho de gelo, até total dissolução do material, seguido da adição de 4 mL de água destilada, de maneira que a concentração final da solução ficasse próxima de 5,5 % para evitar a carbonização do material durante o aquecimento. Esta solução foi mantida em estufa a 100°C por 18 horas (SAEMAN et al., 1954). O excesso de ácido sulfúrico foi neutralizado com carbonato de bário e o precipitado resultante foi removido da solução por filtração, o filtrado foi deionizado por meio de resina catiônica IRA-120 Amberlit (forma H^+). Após uma nova filtração para remoção da resina, a solução resultante foi evaporada a pequeno volume e tratada com boroidreto de sódio, durante 15 horas, à temperatura ambiente (BLAKENEY et al., 1983). Decorrido o período de redução química, os íons sódio foram eliminados da preparação pelo tratamento com a resina IRA-120 Amberlit (forma H^+) e o ácido bórico formado foi removido, na forma de borato de trimetila, por co-destilação com metanol.

4.2.10.3. Acetilação

A reação para formação dos acetatos a partir dos alditóis parcialmente metilados foi efetuada pela adição de 1,2 mL de anidrido acético e 1,2 mL de piridina permanecendo a temperatura ambiente por 16 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963). A reação foi interrompida pela adição de gelo moído, e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual da fração clorofórmica foi

extraída por sucessivas lavagens com solução aquosa de sulfato de cobre a 5% (m/v). À fração clorofórmica, isenta de piridina, foi adicionado sulfato de sódio anidro e em seguida submetida à filtração. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram evaporados à secura e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS).

4.2.11. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi realizada usando o espectrômetro BRUKER modelo Vector 22. A aquisição dos espectros foi feita pelo programa OPUS.

Procedimento: 1 mg de cada EPS nativo e metilado foi macerado com 250 mg de KBr, seco previamente em estufa a 75°C por 24 horas para garantir a isenção de água. As pastilhas utilizadas para as análises foram feitas com a aplicação de uma pressão de 5,5 toneladas por 3 minutos. Os espectros foram realizados na faixa de 3800 a 500 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1}.

4.2.12. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono 13

Os espectros de RMN monodimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance-DRX-400. Os EPS foram solubilizados em D_2O (óxido de deutério). As soluções resultantes (1mL) foram armazenadas em cilindros coaxiais, introduzidas em tubos de 100 x 10 mm d.i. e mantidas a 70 °C para serem analisadas. Os espectros foram obtidos em 400 MHz em relação ao núcleo de ^{1}H (100 MHz em relação ao núcleo de ^{13}C).

Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) relativos aos sinais de ^{13}C e ^{1}H da acetona em δ 30,20 e 2,22, respectivamente.

4.2.13. Análise da homogeneidade e determinação de massa molecular por cromatografia de gel permeação (HPSEC).

Para análise da homogeneidade foram preparadas amostras contendo 1mg de cada EPS em 1mL de solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%). As soluções obtidas foram filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) 0,22 µm e

analisadas em HPLC acoplado ao detector de índice de refração, com fluxo de 0,6 mL/min.

Injeção: foram injetados, separadamente, 200 µL de soluções contendo 200 ng de material de cada um dos EPS e dos padrões.

As corridas cromatográficas foram efetuadas em cromatógrafo SHIMADZU, equipado com um detector de índice de refração diferencial SHIMADZU modelo RID 10A. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação da marca WATERS, com limites de exclusão de 7.10^6, 4.10^5, 8.10^4 e 5.10^3, dispostas em série. O eluente utilizado foi uma solução de nitrato de sódio ($NaNO_3$ 0,1M) contendo azida sódica (0,03%), pressão de 1422 psi a 37ºC e aquisição de dados no programa LC Solution (SHIMADZU CORPORATION).

Para determinar a massa molecular dos EPS estudados foram usados seis padrões de dextrana com massas moleculares de $9{,}40x10^3$, $7{,}72x10^4$, $2{,}66x10^5$, $4{,}10x10^5$, $1{,}10x10^6$ e $2{,}10x10^6$ Da. Com os tempos de retenção referentes aos padrões foi plotado um gráfico do logaritmo das massas moleculares pelos tempos de retenção, e através de uma regressão linear foi obtido a equação da reta que melhor se ajustou aos pontos obtidos. A partir do tempo de retenção dos EPS e da equação da reta foi possível estimar massas moleculares de cada EPS estudado.

4.2.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

As análises eletroforéticas foram realizadas em sistema HOEFER® mini VE (Pharmacia Biotech), utilizando gel de poliacrilamida com espessura de 75mm, constituído de uma zona de gel concentrador (4%) de 14mm de altura com tampão tris-HCl 0,5M pH 6,8, e uma zona de gel separador (6 a 10%) de 83mm com tampão tris-HCl 1,5M pH 8,8.

Preparo de amostras: alíquotas de 5mg de cada um dos EPS foram solubilizadas em 0,75mL de água destilada seguidas da adição de 125µL de solução tris-HCl 0,5M pH 6,8; 0,1mL de glicerol e 25µL de azul de bromofenol 0,5%, totalizando um volume final de 1 mL. A solução resultante foi aquecida a 100°C por dez minutos. Foram aplicados 5µL das amostras correspondendo a 25µg de cada material.

Com a finalidade de obter uma condição adequada de pH foram ensaiadas três condições de corridas variando-se o tipo de tampão e o pH.

Condição 1: tampão tris-glicina 0,02M pH 8,8 com tempo de corrida de 1h45min.
Condição 2: tampão fosfato 0,02M pH 7,6 com tempo de corrida 1h45min.
Condição 3: tampão fosfato 0,02M pH 6,7 com tempo de corrida de 2h15min.

Para todas as condições foi aplicado uma tensão de 110V (corrente contínua) e o tempo de corrida foi determinado pela deslocamento do corante azul de bromofenol (por três quartos do gel separador).

Para a visualização das corridas eletroforéticas os géis foram corados por dois diferentes métodos a fim de visualizar os polissacarídeos.

Coloração pelo método ácido periódico – Schiff (PAS): específico para coloração de carboidratos. O principio do método é a reação entre os aldeídos formados na presença do ácido periódico como o reagente de Schiff (fucsina-ácido sulfuroso) formando um composto colorido com intensidade variando entre rosa e vermelho púrpura.

Reagentes: **solução 1-** ácido acético, metanol e água na proporção de 2:7:11; **solução 2-** ácido periódico 0,7% (m/v) em ácido acético 5% (v/v); **solução 3-** bissulfito de sódio 0,2% (m/v) em ácido acético 5% (v/v). **Reativo de Schiff-** conforme descrito por Fukuda e Kobata (1993).

Procedimento: O gel foi lavado com a solução 1 por duas horas para descorar o azul de bromofenol, em seguida foi deixado imerso na solução 2 por uma hora, e ao término desse tempo foi lavado duas vezes com a solução 3. Após as lavagens, o gel foi deixado por uma hora no reativo de Schiff para o aparecimento das bandas coradas e então foi lavado com água destilada até a remoção do excesso do corante.

Coloração pelo método azul de toluidina: o azul de toluidina é um corante que se liga a compostos negativamente carregados, formando um complexo colorido com intensidade variando do azul claro ao roxo, dependendo do tipo de grupo negativamente carregado presente.

Procedimento: O gel foi submerso em uma solução 0,1% (m/v) de azul de toluidina em ácido acético 5% (v/v) por aproximadamente 5 minutos e, então, foi lavado com água destilada até a remoção do excesso de azul de toluidina, aderida ao gel.

Após a coloração, os géis foram fotografados e deixados por uma hora em solução de glicerina 10% (v/v), em seguida colocados entre duas camadas de papel celofane e após estarem secos, foram guardados.

4.2.15. Análise conformacional

A verificação da conformação ordenada dos EPS quando em solução aquosa pode ser realizada através da complexação com o corante vermelho Congo (OGAWA et al, 1972), cuja estrutura química é mostrada na figura 8.

Reagentes: Solução de vermelho congo 91 μM, NaOH 5M.

Padrão utilizado: dextrana (65 a 74 kDa)

Procedimento: foi preparada uma solução denominada CR/EPS misturando-se as soluções de Vermelho Congo e de EPS na proporção de 1:10. Dez alíquotas de 1mL foram separadas e, em seguida, adicionados à essa solução NaOH 5M e H_2O 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 1. A solução final resultante permaneceu em repouso por 3 horas e, após esse tempo, foi obtido o espectro de absorção no intervalo de 470 a 540 nm, em um espectrofotômetro Shimadzu. A aquisição dos dados foi realizada usando o software UVprobe (SHIMADZU CORPORATION)

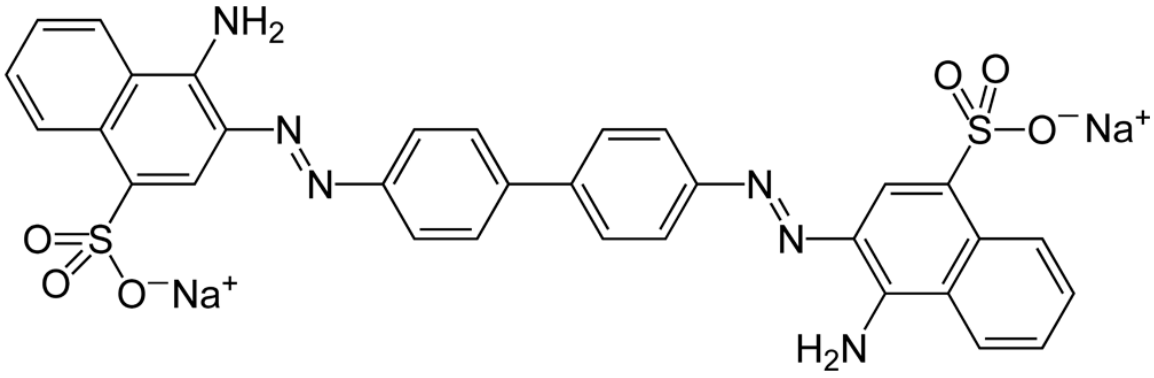

Figura 8: Estrutura química do corante vermelho congo.

Tabela 2 - Ensaio analítico para a formação do complexo.

Tubo	CR/EPS	NaOH 5M (µL)	Água (µL)
1	1 mL	0	100
2	1 mL	10	90
3	1 mL	20	80
4	1 mL	30	70
5	1 mL	38	62
6	1 mL	42	58
7	1 mL	46	54
8	1 mL	50	50
9	1 mL	60	40
10	1 mL	80	20

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação dos polissacarídeos

Durante a síntese dos EPS pelos microrganismos, diversos parâmetros podem influenciar no rendimento e na composição monossacarídica dos polímeros produzidos (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004), que podem acarretar diferenças nas propriedades físico-químicas de suas soluções. Nampoothiri e colaboradores (2003) mostraram que o tempo de incubação, pH do meio de cultivo e fontes de carbono interferem diretamente na estrutura dos polissacarídeos sintetizados. Partindo-se da premissa que o objetivo deste trabalho será conhecer a estrutura dos exopolissacarídeos produzidos por algumas estirpes de rizóbios, o primeiro passo foi realizar a quantificação de açúcares totais, açúcares redutores e proteína; detectar, bem como quantificar, a presença de resíduos de piruvato, acetila e ácido urônico (Tabela 3), sabidamente presentes na maioria dos polissacarídeos produzidos por esse grupo de microrganismo (HEYRAUD et al., 1993; WERNER 2005).

Os teores de açúcares totais, compreendidos entre 80 a 86%, e o baixo percentual de açúcar redutor (próximo de 0,1% para todos os EPS) indicam que, praticamente, todo o carboidrato presente nas amostras encontra-se na forma de macromolécula, excluindo a possibilidade de resíduos da fonte de carbono do meio de cultivo, que certamente foi eliminada durante o procedimento de diálise. A detecção de proteína (4%) pode estar relacionada com a produção de alguma exoenzima produzida pelo microrganismo que, entretanto, não foi investigada neste trabalho.

Tabela 3: Quantificações de açúcares, proteínas e grupos substituintes presente nos EPS produzidos por diferentes linhagens de bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium*.

EPS	Açúcar total (%)	Açúcar redutor (%)	Proteínas (%)	Piruvato (%)	Acetila (%)	Ácido Urônico (%)
R_1	86,1±0,2	~0,1	3,2±0,1	5,9±0,2	3,9±0,3	0,8±0,1
R_2	84,8±0,3	~0,1	4,0±0,3	6,2±0,1	2,7±0,2	1,7±0,1
R_3	81,1±0,1	~0,1	3,8±0,2	1,1±0,1	1,8±0,2	12,7±0,4
R_4	84,1±0,3	~0,1	3,9±0,2	6,1±0,3	3,7±0,4	1,6±0,2

R_1 – EPS produzido por *Rhizobium tropici* (1ª condição); R_2 – EPS produzido por *Rhizobium tropici* (2ª condição); R_3 – EPS produzido por *Mesorhrizobium*; R_4 – EPS produzido por *Rhizobium* sp.

Assim como a maioria dos exopolissacarídeos produzidos por rizóbio, descritos na literatura (MCNEIL et al., 1986; GONZÁLEZ, YORK, WALKER, 1996; SIMSEK, et al., 2009), todos os polímeros investigados neste trabalho apresentaram piruvato, acetila e ácido urônico. O EPS R_3 apresentou maior percentual de ácido urônico (~13%) e menor substituição por resíduos de piruvato (~1%) quando comparado aos demais polissacarídeos produzidos por *Rhizobium*. Embora prematuro para se afirmar, esta diferença poderia estar relacionada ao fato do R_3 ser produzido por um microrganismo de diferente gênero ou seja, *Mesorhizobium.* Essas diferenças químicas podem auxiliar na taxonomia de microrganismos, como defendido por alguns autores (BLACK, SNYDER, HEROUX; 1997, MULDOON et al., 2003; ZDOROVENKO et al., 2009).

Uma observação a respeito de R_3, é que suas soluções são menos viscosas quando comparadas às soluções, na mesma concentração, dos demais EPS estudados. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados nos estudos reológicos efetuados por Aranda-Selverio e colaboradores (2009), que mostraram que R_3 apresenta propriedades reológicas diferentes dos demais, comportando-se como um gel fraco enquanto os EPS R_1, R_2 e R_4, todos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*, apresentam características de gel forte. Uma provável explicação para a menor viscosidade de R_3 pode ser relacionada ao alto teor de ácido urônico em sua composição (RINAUDO, 2004).

5.2. Análise da homogeneidade dos diferentes EPS

Para que os resultados da caracterização química dos polissacarídeos ou de qualquer outro composto biológico sejam confiáveis, é fundamental que o material a ser estudado se apresente puro. Há diversos métodos para verificar esta condição, entretanto os cromatográficos são os mais utilizados. Para este propósito, neste trabalho, foram utilizadas as cromatografia de gel permeação com detector de índice de refração (HPSEC - high perfomance size exclusion chromatography) e eletroforese em gel de poliacrilamida.

5.2.1. Análises de homogeneidade e determinação de massa molecular aparente por HPSEC

A partir do perfil cromatográfico dos quatro EPS (Figura 9) é possível inferir que R_2 (b) e R_3 (c) comportam-se como moléculas puras ou homogêneas, uma vez que eluiram como um único pico na análise. A presença de um ombro nos cromatogramas referentes aos exopolissacarídeos R_1 (a) e R_4 (d) sugere um segundo composto que pode ser um outro polissacarídeo, uma vez que também foi detectado por índice de refração. Embora R_1 e R_2 tenham sido produzidos pela mesma estirpe de bactéria (*Rhizobium tropici*), as condições de cultivo utilizadas para síntese de R_1 favoreceram também a produção de um segundo exopolissacarídeo. Algumas espécies de bactérias da família *Rhizobiaceae* secretam um segundo polissacarídeo, que pode ter em sua composição grupos piruvato e acetila (BECKER; PÜHLER, 1998) ou ainda um glucana β (1→2) cíclica, exclusiva desta família.

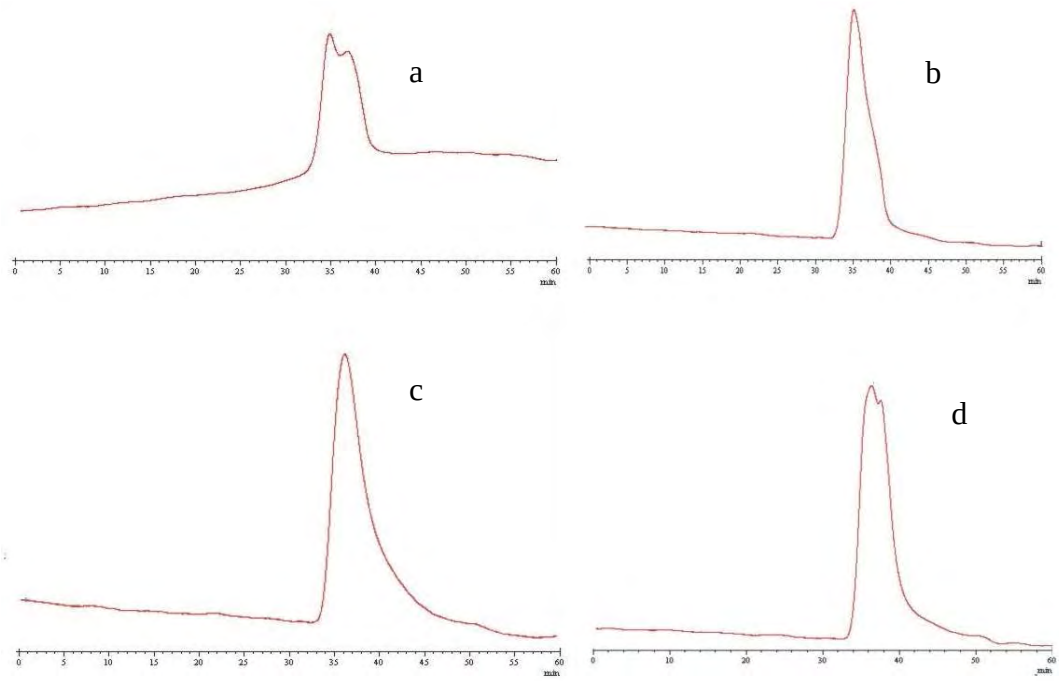

Figura 9: Perfil de eluição para os EPS R_1 (a), R_2 (b), R_3 (c) e R_4 (d) por HPSEC equipado com um detector de índice de refração diferencial. Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de 7.10^6, 4.10^5, 8.10^4 e 5.10^3. Total de EPS aplicado: 200 μg; fluxo: 0,6 mL/min. Eluente: $NaNO_3$ 0,1M contendo azida sódica 0,03% (m/v), pressão de 1422 Psi a 37 ºC.

De acordo com a forma do pico (base mais estreita) é possível inferir que R_2 é um material menos polidisperso, provavelmente por apresentar moléculas com

massas moleculares aparentes mais próximas. Sabidamente, os polissacarídeos são sintetizados, pelos organismos, sem a utilização prévia de um molde, diferentemente da síntese protéica (DNA → RNA → Proteína), portanto são moléculas com elevado grau de polidispersividade. Uma das grandes vantagens em estudar polissacarídeos produzidos por microrganismos está na possibilidade de se estabelecer condições de cultivo para obtenção de polímeros menos polidispersas, portanto, com propriedades físico-químicas com menor variabilidade e maior aplicabilidade industrial.

A cromatografia de exclusão molecular separa os compostos de acordo com suas massas moleculares, onde as maiores eluem antes (BOYER, 1993). Utilizando-se o HPSEC com detector de índice de refração, colunas seqüenciadas com géis de diferentes porosidades e um "pool" de padrões com massas moleculares definidas, é possível chegar à massa molecular aparente de um composto desconhecido. Neste trabalho foram utilizados padrões de dextrana com massas moleculares que variavam de 5,0 x 10^4 a 2,1 x 10^6 Da. Através dos tempos de retenção e dos logaritmos das massas moleculares dos padrões foi realizada uma regressão linear (Figura 10). R_1, R_2, R_3 e R_4 apresentaram tempo de retenção de 35,69; 35,55; 36,80 e 36,36 minutos, respectivamente, tendo assim massas moleculares aparentes superiores a 2,1 x 10^6 Da.

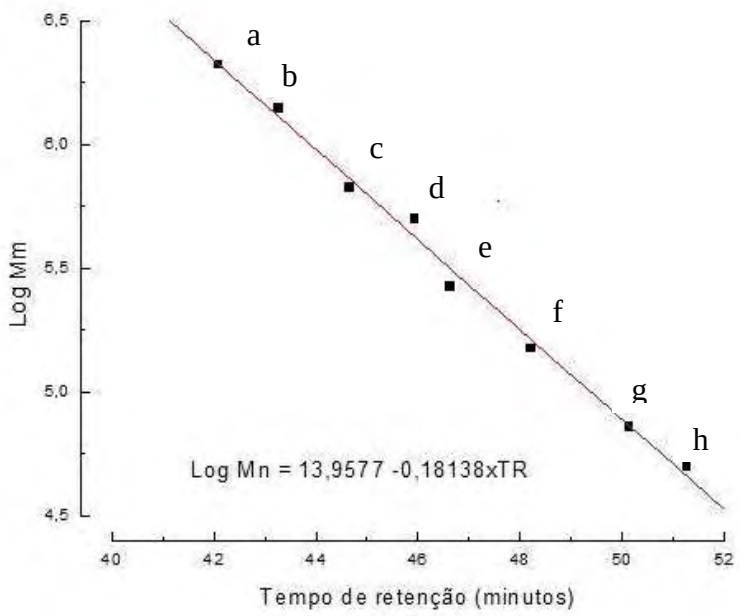

Figura 10: Curva de calibração de massa molecular aparente obtida por HPSEC equipado com detector de índice de refração diferencial. Padrões de massa molecular de a) 2,1x10^6 Da, b) 1,4x10^6 Da, c) 6,7x10^5 Da, d) 5,0x10^5 Da, e) 2,6x10^5 Da, f) 1,5x10^5 Da, g) 7,2x10^4 Da e h) 5,0x10^4 Da.

Assumindo-se a linearidade da curva e extrapolando-se para os tempos obtidos podemos encontrar as massas moleculares aparente para os EPS R_1, R_2, R_3 e R_4 de $30{,}5x10^6$, $32{,}3x10^6$, $19{,}2x10^6$ e $230{,}5x10^6$ Da, respectivamente.

5.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Considerando que todos os quatro EPS apresentam-se ionizados, uma vez que possuem grupamentos capazes de se dissociarem, em função do pH, a eletroforese foi selecionada como um segundo método para verificar a homogeneidade dos materiais. Esta técnica estuda o movimento das moléculas carregadas quando um campo elétrico é aplicado. A migração é influenciada pelo tamanho, forma, carga e composição química da molécula. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), utilizada neste trabalho, tem sobre a eletroforese convencional, a vantagem de se trabalhar com géis de diferentes porosidades pela variação da concentração dos agentes utilizados na reação de polimerização. Este tipo de eletroforese tem melhor resolução porque a separação baseia-se na massa molecular e na mobilidade eletroforética. Zierer e Mourão (2000) utilizaram com sucesso a eletroforese em gel de poliacrilamida para mostrar a homogeneidade de polissacarídeos naturalmente sulfatados produzidos por diferentes esponjas marinhas.

Para esta análise foram ensaiadas três condições de tampões de corrida (pH 8,8, 7,6 e 6,7) para uma separação mais eficiente dos componentes, de cada amostra. O melhor resultado foi obtido em tampão fosfato de sódio pH 7,6 (Figura 11). Após coloração do gel observou-se formação de bandas levemente alargadas, sugerindo polidispersividade. R_2 (Figura 11c) apresentou-se como uma banda mais estreita, indicando menor polidispersividade, quando comparado aos demais. Estes resultados confirmam os dados obtidos por HPSEC. A presença do segundo componente visualizado em R_1 e R_4 na análise do HPSEC não pode ser confirmada na PAGE. Isto se deve, provavelmente, ao tipo de corante utilizado na revelação, uma vez que a presença de grupamentos ácidos é necessária para a interação com o corante. Portanto, é possível que o segundo componente de R_1 e R_4 seja um polímero com poucos grupamentos ácidos, insuficientes para a detecção ou, ainda, um polímero neutro que nem mesmo migrou na corrida eletroforética e tampouco se corou.

Na análise em pH 8,8, os EPS migraram no gel na mesma velocidade que o corante de corrida, independente do tempo ou da voltagem utilizadas, provavelmente por uma maior desprotonação dos grupos ácidos. Em tampão pH 6,7 não ocorreu migração dos EPS pelo gel, indicando que nesse valor de pH há pouco grupamentos ionizados, inviabilizando a análise eletroforética.

Dos dois métodos de coloração utilizados nesta técnica, o que emprega o azul de toluidina se apresentou como melhor opção uma vez que possui como característica se ligar a grupos eletricamente carregados, corando de maneira eficiente os polissacarídeos aplicados. A coloração pelo método de Schiff, utilizado para carboidratos, não foi eficaz, provavelmente pela presença de substituintes nos carbonos C2 ou C3 dos monossacarídeos, pontos essenciais para que haja a reação com o ácido periódico, presente no reativo de Schiff (MELLO; MELLO; PEREZ, 1955).

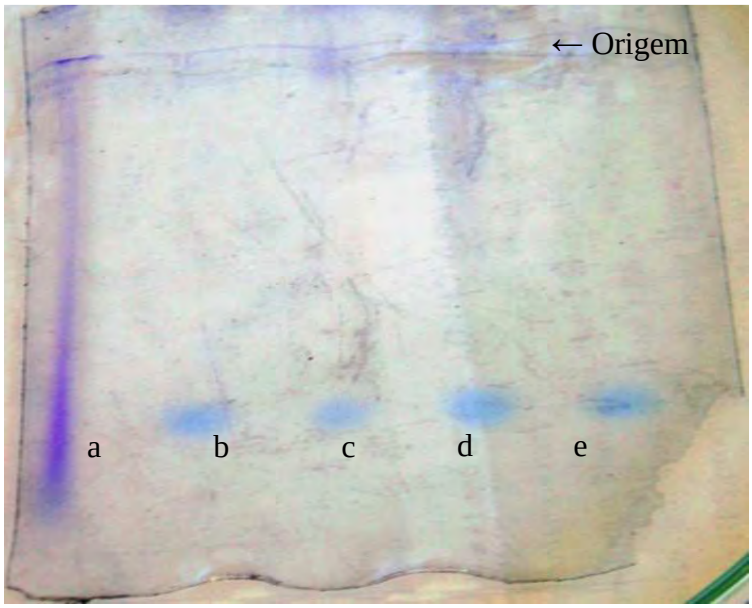

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) corrida com tampão fosfato de sódio pH 7,6 e corada com azul de toluidina. Condições de corrida: 110V por 1h45min. Materiais aplicados: (a) padrão de ácido poligalactourônico, (b) EPS R_1, (c) EPS R_2, (d) EPS R_3 e (e) EPS R_4.

Considerando-se que para a caracterização química de um polímero a pureza do material é essencial, foram selecionados para dar continuidade aos estudos apenas aqueles que se mostraram homogêneos de acordo com as análises efetuadas, ou seja, os EPS R_2 produzido pelo *Rhizobium tropici* na segunda condição de cultivo, e o EPS R_3 sintetizado pela bactéria *Mesorhizobium*.

5.3. Determinação da conformação da cadeia em solução

Os polissacarídeos, quando em solução, podem apresentar três tipos de conformação: totalmente ao acaso, duplas hélices ou triplas hélices, sendo estas duas últimas estabilizadas por ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas (GARCIA-OCHOA et al., 2000; KANEDA et al., 2002; DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004). A conformação de um polissacarídeo, quando em solução, pode ser modificada enfraquecendo as ligações de hidrogênio e isso pode ser conseguido através do aumento da alcalinidade do meio, de temperaturas elevadas ou de um solvente aprótico como o DMSO (FALCH et al., 2000).

Diversos autores afirmam que xantana, um exopolissacarídeo ácido estruturalmente semelhante aos estudados neste trabalho, pode apresentar estrutura em hélice dupla ou ao acaso de acordo com a temperatura e força iônica da solução (FERNANDES 1994; CAPRON; BRIGAND; MULLER 1997; RODD; DUNSTAN; BOGER 2000; VIEBKE; WILLIAMS 2000; SERENO; HILL; MITCHELL 2007).

Segundo Ogawa e colaborados (1972), para o corante vermelho congo se complexar com um determinado polissacarídeo, este precisa apresentar uma conformação ordenada quando em solução, que pode ser acompanhada pelo deslocamento hipsocrômico (deslocamento para o azul) do maior absorção (λ_{MAX}) do vermelho congo, que é um composto que, quando em solução, possui um espectro de absorção UV-visível com um único pico próximo a 493 nm. A formação do complexo (corante/EPS) pode ser acompanhada comparando-se o deslocamento do pico de absorção do complexo com o do vermelho congo (controle), em diferentes concentrações de NaOH (Figura 12).

Concentrações de NaOH, entre 0,01 e 0,19M, levam a uma perda gradual da rigidez da estrutura do polissacarídeo devido ao aumento da força iônica, reduzindo assim a viscosidade e facilitando a complexação com o corante Vermelho Congo. Em concentrações entre 0,19 a 0,24M de NaOH ocorre o colapso das pontes de hidrogênio que mantêm a estrutura coesa em solução, dando início à transição da conformação helicoidal (ordenada) para a randômica (desordenada), perdendo assim a capacidade de formar complexos com o corante. Em concentrações acima de 0,24M há predominância de conformações ao acaso.

Vasconcelos e col. (2008) utilizou esta técnica para determinar a conformação de quatro EPS produzidos por isolados de *Botryosphaeria* de diferentes

fontes, sendo que o EPS produzido pelo microrganismo isolado de laranja apresentou um maior deslocamento de λ_{MAX},(501 nm na concentração de 0,2 M de NaOH).

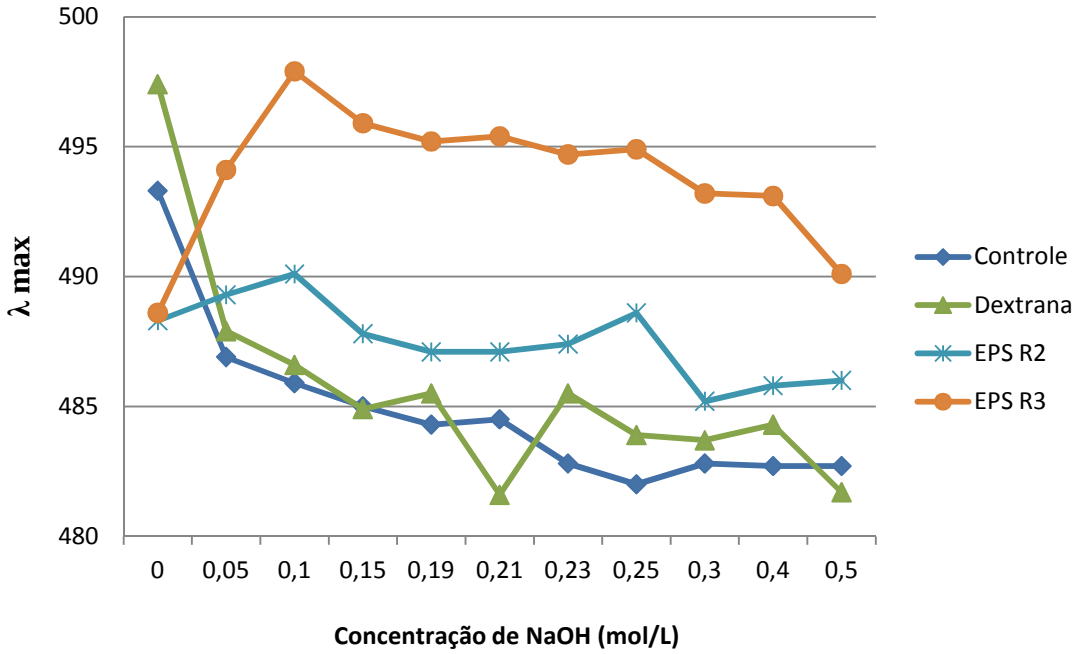

Figura 12: Análise conformacional dos EPS R_2 e R_3 de acordo com a mudança de absorção máxima do complexo Vermelho Congo-EPS, em diversas concentrações de NaOH. Vermelho Congo e dextrana foram utilizados como controles

O exopolissacarídeo R_3 apresentou maior deslocamento de λ_{MAX}, (498 nm na concentração de 0,1 M de NaOH), sugerindo uma estrutura espacial menos organizada, quando comparado com EPS R_2 uma vez que em uma mesma concentração de hidróxido de sódio, R_3 apresenta uma maior complexação com o corante vermelho Congo. Também pode ser observado que tanto EPS R_2 quanto EPS R_3 apresentaram um pequeno descolamento quando comparados com o controle, sugerindo a existência de porções onde a molécula assume uma estrutura conformacional ordenada, possivelmente em hélice dupla. A estrutura organizada está, normalmente, relacionada com a viscosidade das soluções dos polissacarídeos. O EPS R_3 parece, de acordo com os resultados desta análise, ser uma molécula menos organizada que R_2 e segundo Aranda-Selvério e colaboradores (2010), menos viscosa que o EPS R_2.

5.3. Hidrólise ácida total e análise por HPAEC/PAD dos exopolissacarídeos R_2 e R_3 em três condições diferentes.

A estrutura química primária de um EPS é definida por sua composição monossacarídica, configuração e posição da ligação glicosídica e da presença ou não de substituintes (PAZUR, 1994).

A obtenção de monossacarídeos, a partir de polissacarídeos, consiste na quebra das ligações glicosídicas que os unem, através de hidrólise ácida total, que pode ser feita com diferentes tipos de ácidos, temperaturas e tempos. Os monômeros assim obtidos são posteriormente analisados por cromatografia líquida de íons em alta presssão (HPAEC), acoplada a um detector de óxido redução (PAD – Pulsed Amperometric Detector) (BONGIOVANI, 2008; VASCONCELOS et al., 2008).

A tabela 4 mostra os resultados das diferentes condições de hidrólise ensaiadas para os EPS R_2 e R_3, e as condições 1 e 3 parecem ter sido mais eficientes para a liberação dos monossacarídeos.

Dados da literatura (MULDOON et al., 2001) indicam que a presença de açúcares ácidos em polissacarídeos dificulta a hidrólise ácida, uma vez que as ligações glicosídicas destas unidades são estabilizadas, tornando-as mais resistentes ao ataque ácido, pois a aproximação do próton (H^+), responsável pelo rompimento da ligação, é dificultada pelo grupo ácido ligado a estrutura. Segundo Van´t Hoff a cada aumento de 10 °C na temperatura de uma reação química, a velocidade da mesma tende a se duplicar. Portanto, os melhores resultados encontrados para o EPS R_3, que apresenta 13% de ácido urônico, foi a condição de temperatura mais elevada (121°C). Para R_2, com 2% de ácido urônico, a primeira condição de hidrólise parece ter sido um pouco mais apropriada que a terceira condição por apresentar um rendimento mais elevado. Tempos de reação longos associados a alta concentração de ácidos, como os utilizados para a segunda condição parecem conduzir degradação nos materiais, uma vez que os rendimentos na obtenção dos monômeros foram os menores tanto para R_2 quanto para R_3.

Os resultados da composição monossacarídica (Tabela 4) de EPS R_2 e R_3 mostraram glucose e galactose nas relações molares de 4:1 e 5:1, respectivamente. Também foram detectados traços de manose em ambos EPS (1% para R_2 e 3% para R_3). De acordo com a literatura microrganismos de linhagens diferentes ou com diferenças

apenas nas condições de cultivos, produzem polissacarídeos semelhantes nos quais a cadeia principal, normalmente, é a mesma, com variações no grau de ramificação.

Castellane e Lemos (2007), estudaram EPS de duas estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080 produzidos em quatro fontes de carbono diferentes, estes EPS apresentaram glucose e galactose com componentes majoritários com relações molares variando entre 4:1 e 3:1, traços de manose e ramnose e cerca de 12% de ácidos urônicos.

As três condições de hidrólise ácida utilizadas neste trabalho geraram apenas monossacarídeos neutros, entretanto os resultados obtidos pela quantificação de ácidos urônicos mostraram a presença de monossacarídeos ácidos na estrutura química desses polímeros. Para obtenção de monossacarídeos ácidos, condições diferentes de hidrólise devem ser ensaiadas. Essas condições normalmente degradam os monômeros neutros.

Tabela 4: Composição em monossacarídeos dos EPS R_2 e R_3 em três condições diferentes de hidrólises.

EPS / monossacarídeos		**Condição 1 (TFA 4M; 100 °C; 4h)**			**Condição 2 (TFA 5M; 100 °C; 12h)**			**Condição 3 (TFA 2M; 121 °C; 2h)**		
		Massa detectada (ng/25µL)	Percentual molar (%)	*Porcentagem de recuperação (%)*	Massa detectada (ng/25µL)	Percentual molar (%)	*Porcentagem de recuperação (%)*	Massa detectada (ng/25µL)	Percentual molar (%)	*Porcentagem de recuperação (%)*
R_2	Galactose	55	20	*66*	37	17	*61*	44	20	*63*
	Glucose	216	79		178	81		177	79,0	
	Manose	4	1		5	2		3	1	
	Total	275	100		220	100		224	100,0	
R_3	Galactose	36	17	*50*	22	16	*44*	39	16	*66*
	Glucose	167	80		112	81		189	81	
	Manose	6	3		4	3		7	3	
	Total	209	100		138	100		235	100,0	

* Hidrólises realizadas em triplicata

5.5. Comparação dos espectros de FT-IR dos exopolissacarídeos R_2 e R_3 nativos e metilados

Para elucidar a posição de ligações, os polissacarídeos em estudo foram submetidos a metilação. A eficiência da reação foi efetuada pela comparação dos espectros de FT-IR do material não metilado e de seu produto após a terceira metilação (Figura 13). Durante o processo de metilação, os grupos OH vão sendo gradativamente substituídos por grupos metila (-CH_3). Esta substituição provoca uma alteração nos espectros de FT-IR que envolve a diminuição das bandas de hidroxila (região de 3600 a 3100 cm^{-1}) e um aumento dos sinais de estiramento C-H, devido a entrada do grupo –CH_3. Para uma metilação ser considerada efetiva toda a banda de hidroxila deve desaparecer.

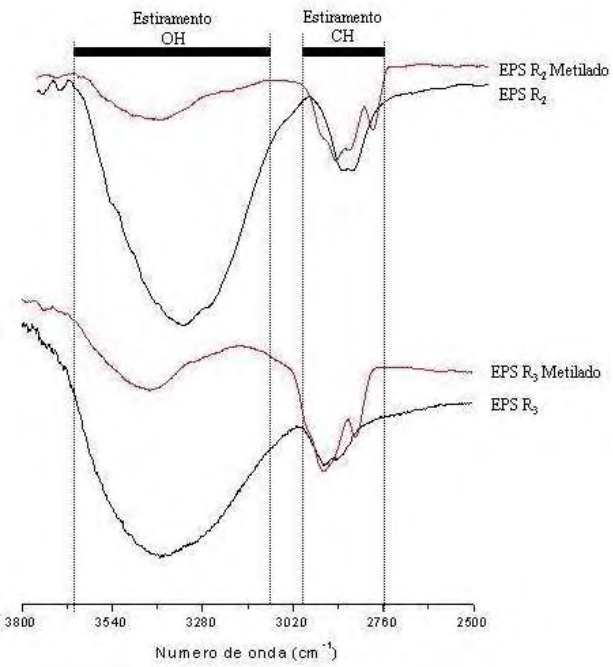

Figura 13: Espectros de infravermelho (região de 3800 a 600 cm^{-1}) dos EPS R_2 e R_2 metilado (superior) e R_3 e R_3 metilado (inferior).

A presença da banda de OH nos espectros dos metilados sugere que as hidroxilas livres não foram totalmente substituídas por metila, apesar de três reações de metilação terem sido efetuadas. Isso pode ser atribuído ao excesso de substituintes presentes nos EPS R_2 e R_3, criando um impedimento estérico dificultando a aproximação dos reagentes. Embora todo o procedimento tenha sido efetuado, os

resultados por GC/MS mostraram que esta técnica é ineficiente quando os polímeros são muito substituídos.

5.6. Análises espectroscópicas do exopolissacarídeo produzido pela bactéria Rhizobium tropici (EPS R_2)

As técnicas espectroscópicas de FT-IR, RMN de ^{1}H e ^{13}C são ferramentas de grande importância para a caracterização química, baseando-se nas propriedades físico-químicas das moléculas. São métodos não destrutivos e dispensam qualquer tipo de modificação química na estrutura da molécula tornando essas técnicas excelentes para análise estrutural.

Dentre os métodos espectroscópicos, o FT-IR possui algumas vantagens, incluindo a facilidade de preparação, a pequena quantidade de amostra necessária para as análises e a relativa rapidez na obtenção dos dados (BOULET; WILLIANS; DOCO, 2007). A aquisição espectral é feita diretamente na amostra sólida dispersa em KBr. Para carboidratos, essa técnica permite identificar alguns componentes estruturais específicos, como a configuração das ligações glicosídicas, a presença de ácido urônico e até mesmo de proteína (GRAY et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2008).

O exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Rhizobium tropici* (EPS R_2) foi submetido à análise por FT-IR, cujo espectro é mostrado na figura 14-a, onde se podem observar sinais característicos para carboidratos. Na região de freqüência de grupo uma banda compreendida entre 3600 a 3100 cm^{-1} e um sinal próximo a 1650 cm^{-1} foram atribuídos, respectivamente, ao estiramento e a deformação angular do grupo OH (LIU et al., 2007). O sinal em 1225 cm^{-1} e as bandas nas regiões de 1200 a 1000 cm^{-1} e 3000 a 2800 cm^{-1} foram atribuídos às deformações das ligações C-O-C (éter), aos estiramentos C-C e aos estiramentos C-H, respectivamente (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Também foi detectado sinal na região próxima a 1750 cm^{-1}, referente a carbonila (C=O) dos ácidos carboxílicos presentes nos ácidos urônico e pirúvico.

Um dado muito importante obtido através desta análise é a configuração das ligações glicosídicas (α e β), que apesar de resultarem em uma mesma banda na região de grupos, geram sinais distintos na região de impressão digital dos espectros. Os polímeros que possuem ligações em configuração α geram sinais próximos a 850 cm^{-1} e aqueles em configuração β apresentam sinais próximos à região

de 895 cm^{-1}. A região de impressão digital do espectro de R_2 (figura 14-b) mostra sinais próximos a 900 cm^{-1} sugerindo que este polímero possua apenas ligações em configuração β, uma vez que não há bandas nas proximidades de 850 cm^{-1}, característico de ligação glicosídica em configuração α.

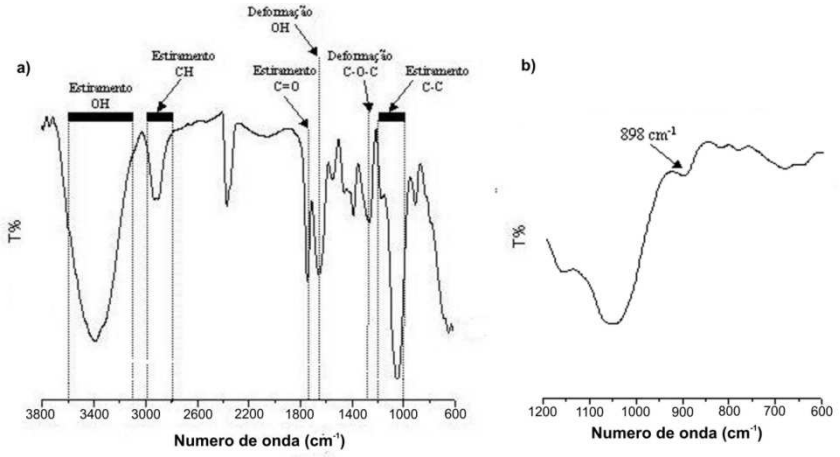

Figura 14: Espectro de FT-IR obtido do EPS R_2 produzido pelo microrganismo *Rhizobium tropici* - a) 3800 a 600 cm^{-1} e b) 1200 a 600 cm^{-1}.

As análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos polissacarídeos são interpretadas correlacionando-se os deslocamentos químicos obtidos das ressonâncias dos átomos individuais de hidrogênio e carbono, com dados previamente coletados tais como composição monossacarídica. Deste modo as atribuições feitas sobre os sinais dos polissacarídeos são, de certa forma, dependentes da precisão dos experimentos realizados anteriormente.

Os deslocamentos químicos de prótons e de carbono são sensíveis aos substituintes ligados a estrutura polimérica, possibilitando determinar tipos e posições de ligações presentes na molecula (DUUS; GOTFREDSEN; BOCK; 2000).

No espectro de RMN de ^{1}H do EPS R_2 (Figura 15) pode ser observado uma grande variedade de sinais na região compreendida entre 1,20 a 1,50 ppm, sendo o mais intenso em 1,47 ppm, atribuído aos hidrogênios metílicos presentes no grupo piruvato (AMEMURA; HARADA, 1983; MCNEIL et al., 1986; ERBING et al., 1995; SIMSEK et al., 2009) e de 1,90 a 2,10 ppm, com sinal de maior intensidade em 2,06 ppm, associados aos hidrogênios metílicos do grupo acetil *O*-ligado (AMEMURA; HARADA, 1983; LEIGH et al., 1985; MCNEIL et al., 1986; COURTOIS et al., 1994; FALK et al., 1996; TAMAKI et al., 2008; SIMSEK et al., 2009; ELBOUTACHFAITI,

2010). Esses valores de deslocamentos químicos confirmam a presença de piruvato e acetil na estrutura do EPS R_2.

A ausência de sinais na região compreendida entre 2,50 a 3,00 ppm, relacionada a prótons metilênicos (LEIGH et al., 1985; CHOULY et al., 1995; SIMSEK et al., 2009), confirma que não há grupos succinil fazendo parte da estrutura polissacarídica, embora a presença deste substituinte não seja rara em exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias da família Rhizobeaceae (MATULOVÁ, et al., 1994; GONZÁLEZ, YORK, WALKER, 1996; SIMSEK et al., 2009). Entre 3,40 e 4,50 ppm são mostrados os prótons que constituem o anel heterocíclico dos carboidratos, excluindo-se o próton anomérico (H-1). O intenso sinal em 3,49 ppm pode ser resultante da sobreposição dos sinais ressonantes referentes ao H-5 (LEVERY et al., 1991; CHOULY et al., 1995) e aos hidrogênios dos grupos metil 4-*O*-ligados que podem estar presentes no ácido glucurônico (DUDMAM 1978; MORT et al., 1983). A confirmação da presença deste substituinte pode ser realizada pelas análise de RMN de ^{13}C onde os sinais de C-5 e do carbono metílico *O*-ligado ressonam em campos diferentes.

Na região referente aos prótons anoméricos foram detectados os sinais (Figura 15-a) em 4,52, 4,73 e 4,81 ppm indicando um polímero com pelo menos três unidades com ambientes químicos distintos. Qualquer diferenciação na estrutura de uma das unidades, seja uma ligação ou uma substituição, resulta em um deslocamento do próton anomérico, possibilitando sua diferenciação das demais (MCNEIL et al., 1986).

Os sinais de ressonância com deslocamentos químicos entre 4,30 e 4,90 ppm são atribuídos aos prótons anoméricos em configuração β, enquanto valores superiores as 5,00 ppm correspondem a prótons em configuração α (MCNEIL et al., 1986). A partir desta informação supõe-se que o EPS R_2 tenha suas unidades monossacarídicas em configuração β, confirmando os resultados encontrados a partir do espectro de FT-IR.

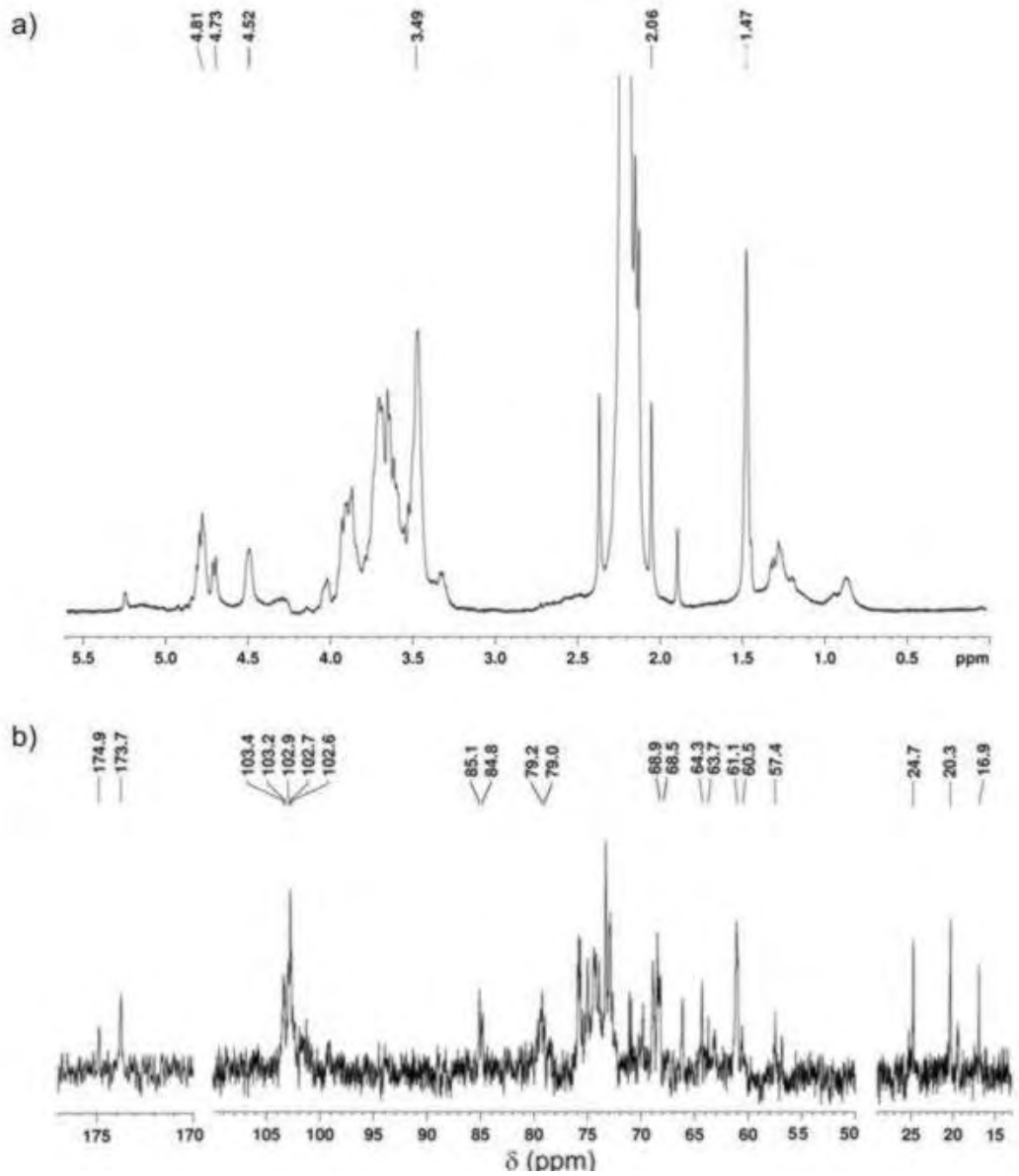

Figura 15: Espectro de RMN a) ^{1}H e b) ^{13}C obtido do EPS R_2 produzido pelo microrganismo *Rhizobium tropici*. Obtido em óxido de deutério a 70 °C utilizando-se freqüência de 400 MHz para prótons e 100 MHz para ^{13}C.

Os espectros de RMN de ^{13}C para hexoses podem ser divididos em três regiões principais. De 60 a 64 ppm são visualizados os deslocamentos químicos referentes ao carbono primário (C-6). Em polissacarídeos constituídos por hexoses, a ausência de sinais nessa região pode indicar que a hidroxila do C-6 está envolvida na ligação glicosídica ou, ainda, a presença de um deoxi-açúcar. Para polissacarídeos, a região entre 90 a 112 ppm mostra os deslocamentos químicos referentes ao carbono anomérico, variável em função do tipo de ligação, da conformação (piranosídica ou furanosídica), da configuração (α ou β) e das série (D ou L) das unidades

monossacarídicas. Os demais sinais, compreendidos entre 67 a 75 ppm estão associados aos carbonos livres, pertencentes ao anel das unidades monossacarídicas, que uma vez substituídos são deslocados para campo mais baixo – α shift – (APPANNA, PRESTON, 1987).

O espectro de RMN de ^{13}C do EPS R_2 (Figura 15-b), apresenta muitos sinais, indicando uma complexidade condizente com a estrutura de um heteropolissacarídeo. Os dois sinais em campo alto, 20,3 e 24,7 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos grupos metílicos (URAI et al., 2007; ZHAO et al., 2010) do acetil e piruvato, presentes na molécula.

Quatro sinais na região de C-6 podem indicar que o polímero possui quatro unidades com ambientes químicos distintos. Segundo Rinaudo e Vincendon (1982) há deslocamento dos sinais de C-6 livre para campo mais baixo (α-shift) quando grupamentos acetil ou piruvato ligam-se a molécula (60,5 → 63,7 ppm, 61,1 → 64,3 ppm). Nos exopolissacarídeos de *Rhizobium* a ligação glicosídica do tipo 1→6 geralmente está associada aos pontos de ramificação, uma vez que a presença de grupos piruvato ligados, geralmente, em C-4 e C-6 (HER et al., 1990; LEVERY et al., 1991; ERBING et al., 1995) limitam esse tipo de ligação.

Os sinais em 84,8 e 85,1 ppm podem ser atribuídos aos carbonos C-3-*O*-substituídos (o deslocamento químico de um C-3 não substituído é cerca de 78 ppm), sinais em 79,0 e 79,2 ppm são referentes aos C-4-*O*-substituídos (YANG; ZHANG; 2009) e os sinal em 68,5 e 68,9 ppm podem ser atribuídos aos C-6 envolvidos na ligação glicosídica (CUI, et al., 2005). Exopolissacarídeos produzidos por bactérias da família *Rhizobeaceae* possuem ligações do tipo 1→3 e 1→4 entre os resíduos monossacarídicos de suas estruturas (HISAMATSU et al., 1997; GUENTAS et al., 2000; KACI et al., 2005). Os demais sinais entre 75,8 a 63,7 ppm correspondem aos carbonos C-2 a C-5 das diferentes unidades que compõem o heteropolímero, e portanto não há possibilidade de se atribuir os sinais de forma segura.

Na região de carbonos anoméricos, os sinais entre 103,4 a 102,6 ppm estão relacionados com C-1 das unidades β-D-glucopiranosídicas, β-D-galactopiranosídicas (substituídas ou não com piruvato) e ácido urônico. Nessa mesma região do espectro encontra-se o sinal de deslocamento químico do carbono quaternário do piruvato (C-2) resultante da ligação do composto à estrutura polissacarídica, formando um acetal (RINAUDO; VINCENDON, 1982). Os sinais 173,7 e 174,9 ppm

foram atribuídos as carboxilas presentes nos ácidos urônico/acetato e pirúvico, respectivamente (RINAUDO et al, 1983; URAI et al., 2007; ELBOUTACHFAITI et al., 2011).

O sinal em 16,9 ppm é, geralmente, associado aos grupos metila de deoxiaçúcares. Nas condições de hidrólise realizadas neste trabalho não foi detectada a presença de deoxiaçúcar, entretanto, Castellane e Lemos (2007) encontraram traços de rhamnose (~0,1% m/m) em polissacarídeos produzidos por *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080. Fortalecendo esta suposição o pequeno sinal em 5,40 ppm, encontrado em no espectro de RMN-^{1}H (figura 15-a), pode ser atribuído ao próton anomérico da α-ramnose.

O sinal em 57,4 ppm é atribuído ao grupo metil-*O*-ligado ao ácido urônico, uma vez que estas unidades são comuns em polissacarídeos da família Rhizobeaceae (DUDMAM 1978; MORT et al., 1983). A determinação da posição exata dos grupos acetil na estrutura não pode ser realizada com a utilização da RMN monodimensionais. A tabela 5 apresenta as atribuições realizadas nos espectros de RMN de prótons e carbono-13.

Tabela 5: Atribuições realizadas para os espectros de RMN de prótons e carbono-13 do EPS R_2

Unidade	RMN	C-1	C-3	C-4	C-6	Carboxila	Metil
Piruvato	^{13}C	-	-	-	-	174,9	24,7
	^{1}H	-	-	-	-	nd	1,49
Acetil	^{13}C	-	-	-	-	173,7	20,3
	^{1}H	-	-	-	-	nd	2,06
3)-β-D-Me-4-*O*-GluA*p*-(1	^{13}C	102,6	85,1	nd	-	173,7	57,4
	^{1}H	nd	nd	nd	-	nd	3,49
4,6)-β-D-Glu*p*-(1	^{13}C	102,7	nd	79,0	68,9	-	-
	^{1}H	nd	nd	nd	nd	-	-
4)-β-D-Glu*p*-(1	^{13}C	102,9	nd	79,2	60,5	-	-
	^{1}H	nd	nd	nd	nd	-	-
3)-β-D-Glu*p*-(1	^{13}C	103,2	84,8	nd	61,1	-	-
	^{1}H	nd	nd	nd	nd	-	-
β-D-Galp-(1	^{13}C	103,4	nd	nd	63,7/64,3	-	-
	^{1}H	nd	nd	nd	nd	-	-

nd = não determinado

Com os resultados encontrados até o momento presente, são propostas duas possíveis estruturas para o exopolissacarídeo R_2 produzido pela bactéria *Rhizobium tropici* (figura 16).

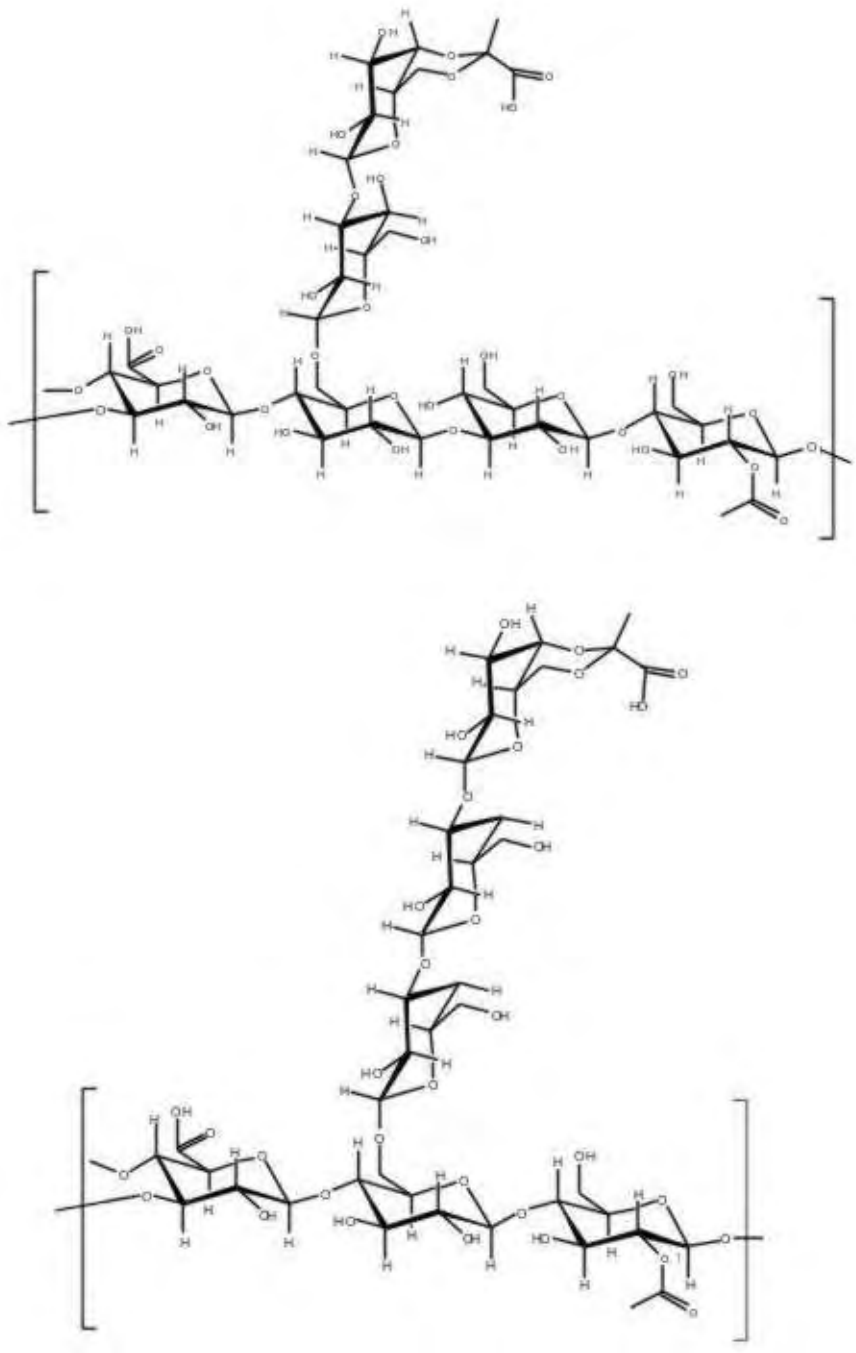

Figura 16: Prováveis estruturas químicas para o EPS R_2

5.6. Análises espectroscópicas do exopolissacarídeo produzido pela bactéria Mesorhizobium (EPS R_3)

O espectro de FT-IR do EPS R_3 (Figura 17-a) foi semelhante ao EPS R_2. Foram detectadas vibrações especificas para carboidratos nas regiões de 3600 a 3100 cm^{-1}, 3000 a 2800 cm^{-1}, 1200 a 1000 cm^{-1} e o sinal em 1225 cm^{-1} atribuídos aos estiramentos do grupo OH, C-H e C-C e as deformações das ligações C-O-C, respectivamente. O sinal na região de 1750 cm^{-1} de ambos os espectros, correspondente a carboxila dos ácidos urônicos e pirúvico e na carbonila do grupamento acetila. A intensidade da banda é semelhante à encontrada no espectro de FT-IR do EPS R_2.

A figura 17-b mostra a região de impressão digital do EPS R_3 com bandas de absorção próximas a 900 cm^{-1} e uma leve deformação, entretanto sem a formação de bandas detectáveis, nas proximidades de 850 cm^{-1}, sugerindo que este polímero possua majoritariamente ligações em configuração β.

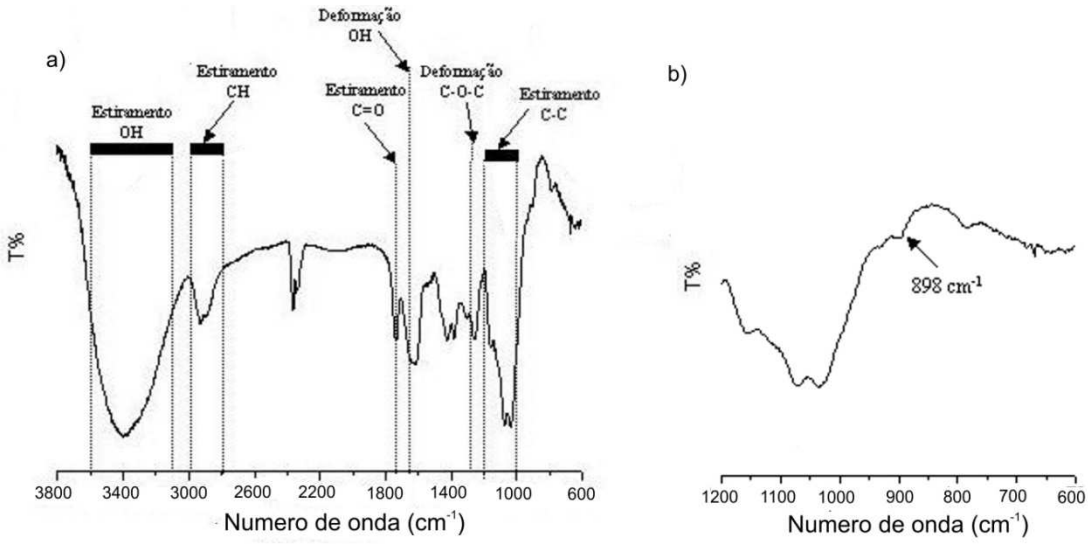

Figura 17: Espectro de FT-IR obtido do EPS R_3 produzido pelo microrganismo *Mesorhizobium* nas regiões de a) 3800 a 600 cm^{-1} e b) 1200 a 600 cm^{-1}.

O espectro de RMN de ^1H do EPS R_3 é mostrado na figura 18-a. Pode-se observar sinais na região compreendida entre 1,20 a 1,50 ppm, sendo o de maior intensidade em 1,28 ppm, atribuída aos hidrogênios presentes no piruvato (ERBING et al., 1995; TAMAKI et al., 2008; SIMSEK et al., 2009) e de 1,90 a 2,10 ppm associados aos hidrogênios do grupo acetil com um sinal mais intenso em 1,93 ppm (COURTOIS et al., 1994; SIMSEK et al., 2009; ELBOUTACHFAITI, 2010).

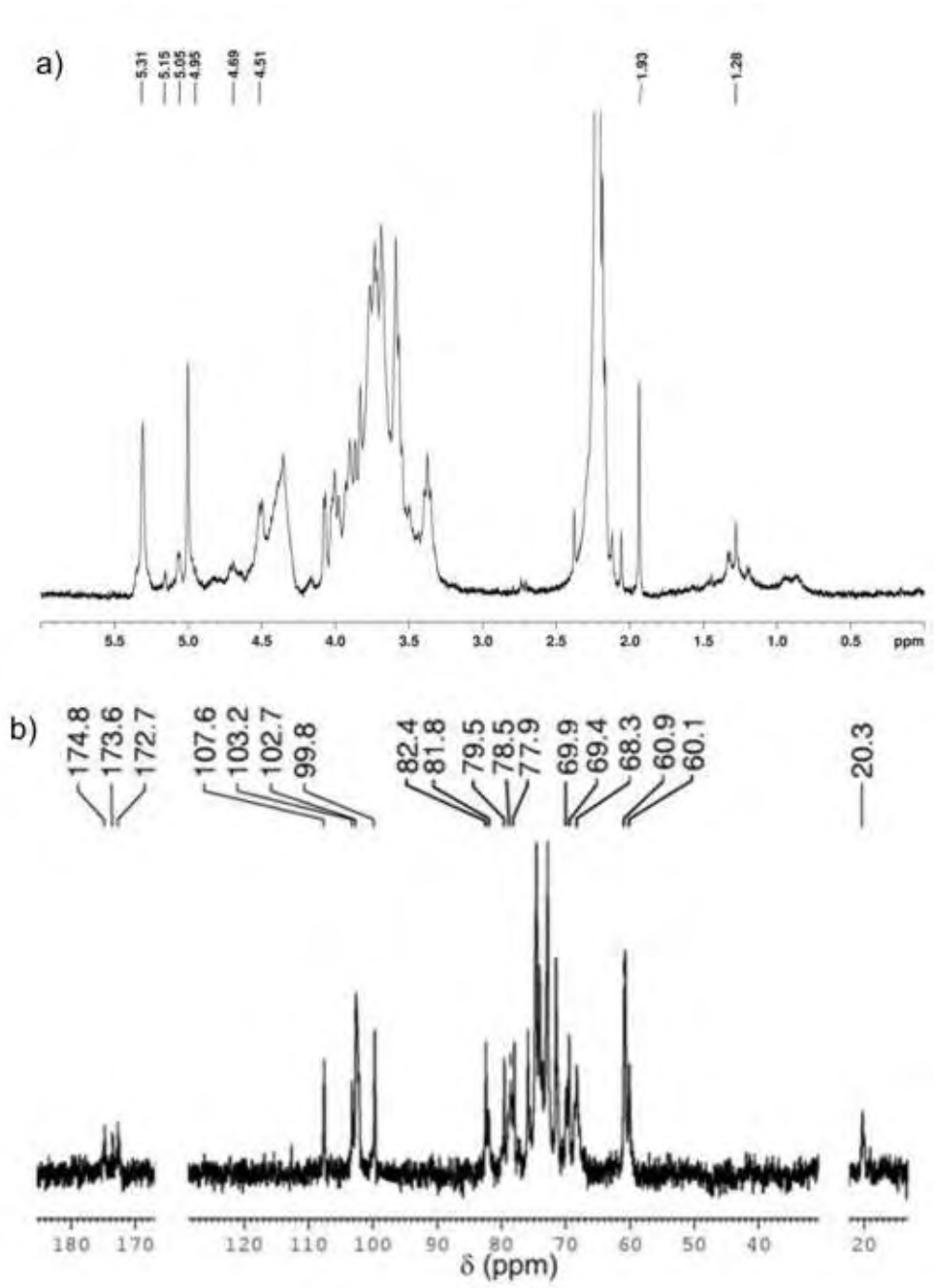

Figura 18: Espectro de RMN a) ^{1}H e b) ^{13}C obtido do EPS R_3 produzido pelo microrganismo *Mesorhizobium*. Obtido em óxido de deutério a 70 °C utilizando-se freqüência de 400 MHz para prótons e 100 MHz para ^{13}C.

A ausência de sinais na região de 2,5 a 3,0 ppm indica que não há substituição por succinil no exopolissacarídeo R_3, produzido pelo *Mesorhizobium* (SIMSEK et al., 2009). Os sinais compreendidos entre 3,4 a 4,5 ppm são referentes aos prótons não anoméricos do anel heterocíclico das unidades monossacarídicas (ERBING et al., 1995; GUENTAS et al., 2000; LIU et al., 2008), a intensidade do sinal em 3,49 ppm, semelhante aos demais sinais desta região indica que, diferentemente de R_2, o EPS

produzido pela bactéria *Mesorhizobium* não possui grupos metil *O*-ligados ao ácido urônico.

O EPS R_3 possui seis grupos de sinais próximos a 4,69, 4,95, 5,05, 5,15 e 5,31 ppm sugerindo a existência de unidades monossacarídicas em cinco situações distintas. O sinal em 5,31 ppm pode ser atribuído às unidades de ácido α-D-glucurônico e 5,15 ppm às unidades β-D-galactofuranosídicas (AHRAZEM et al., 2001). Os demais sinais são associados as unidades D-glucopiranosídicas presentes na estrutura do polímero.

No espectro de RMN ^{13}C do polissacarídeo produzido pela bactéria *Mesorhizobium* (Figura 18) o sinal em 60,1 ppm é atribuído ao C-6 livre da unidade de β-D-galactofuranose e o deslocamento em 60,9 ppm atribuídos ao C-6 livre de unidades D-glucopiranose. Os sinais em 69,4 e 69,9 ppm às unidades C-6-*O*-substituídas, indicando a presença de ligações (1→6). Os deslocamentos químicos em 82,4 e 81,8 ppm foram atribuídos aos C-3-*O* substituídos e 79,5, 78,5 e 77,9 ppm aos C-4-*O* substituídos (CHOULY et al., 1994).

Na região referente aos carbonos anoméricos o sinal em 99,8 ppm (Figura 18-b) foi atribuído ao C-1 das unidades de ácido α-D-glucurônico (AONO, 1990) e em 102,7 e 103,2 ppm ao C-1 das unidades β-D-glucopiranosídicas (DELBOGO et al., 1998; CORRADI DA SILVA et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008). O deslocamento químico em 107,6 ppm foi atribuído ao carbono anomérico das unidades β-D-galactofuranosídicas que, embora raro, pode ser encontrada em polissacarídeos bacterianos (LEMERCIMIER; JONES, 2006).

Os sinais de deslocamento químico em 174,8 ppm foram atribuídos aos grupos piruvato e 173,6 e 172,7 ppm às carbonilas dos ácidos urônicos (URAI et al., 2007). A presença destes dois sinais indica que há unidades distintas de ácido glucurônico na cadeia polissacarídica. O sinal em 20,3 ppm foi atribuído aos grupos metílicos presentes no acetil e piruvato (URAI et al., 2007; ZHAO et al., 2010). A tabela 6 apresenta todas as atribuições nas análises de RMN de prótons e carbono-13 do EPS R_3.

Tabela 6: Atribuições realizadas para os espectros de RMN de prótons e carbono-13 do EPS R_3

Unidade	RMN	C-1	C-3	C-4	C-6	Carboxila	Metil
Piruvato	^{13}C	-	-	-	-	174,8	20,3
	^{1}H	-	-	-	-	nd	1,49
Acetil	^{13}C	-	-	-	-	173,6	20,3
	^{1}H	-	-	-	-	nd	1,93
3)-β-D-GluA*p*-(1	^{13}C	99,8	81,8	nd	-	172,7	-
	^{1}H	5,31	nd	nd	-	nd	-
3,6)-β-D-Glu*p*-(1	^{13}C	103,2	82,4	nd	69,4	-	-
	^{1}H	5,05	nd	nd	nd	-	-
4)-β-D-Glu*p*-(1	^{13}C	102,7	nd	79,5/78,5/77,9	60,9	-	-
	^{1}H	4,95	nd	nd	nd	-	-
β-D-Gal*f*-(1	^{13}C	107,7	nd	nd	60,1/68,3	-	-
	^{1}H	5,15	nd	nd	nd	-	-

nd = não determinado.

Considerando a complexibilidade do EPS R_3 bem como a ausência de informação à respeito da estrutura desse polímero na literatura científica, não foi possivel propor com confiança, com os dados até aqui obtidos, uma provável estrutura química para o exopolissacarídeo produzido pelo *Mesorhizobium* sp. Entretanto, estudos adicionais, com recursos de ressonância magnética nuclear bidimensional serão efetuados para auxiliaram na elucidação dessa molécula.

Vale ressaltar que a caracterização química de polissacarídeos complexos, nos quais os EPS bacterianos se incluem, necessitam de recursos tecnológicos mais avançados, uma vez que as técnicas convencionais da química de carboidratos apresentam limitações para a identificação desses compostos. Essa observação justifica porque há tão poucas informações sobre a estrutura química fina de EPS bacterianos na literatura.

6. CONCLUSÕES

- Os EPS estudados apresentam ácido urônico, acetila e piruvato em suas composições, tendo em média 12% de substituintes em suas estruturas.
- Através de das técnicas de HPSEC e eletroforese PAGE os EPS R_2 e R_3 foram selecionados para dar continuidade aos estudos por se apresentarem homogêneos.
- Os microorganismos produtores dos EPS R_1 e R_4, possivelmente, produzem nas condições estudadas mais de um tipo de polissacarídeo extracelular.
- O microorganismo produtor dos EPS R_1 e R_2 pode produzir EPS puro ou uma mistura de EPS de acordo com o meio de cultivo.
- Devido à presença de ácido urônico em sua estrutura, o EPS R_3 necessita de uma condição de hidrólise mais severa.
- Por hidrólise ácida total e análise em HPAEC/PAD foi determinado que R_2 e R_3 são constituídos por glucose e galactose nas relações molares de 4:1 e 5:1, respectivamente, ambos com traços de manose.
- Quando em solução R_2 e R_3 adotam conformação espacial ordenada, embora R_2 parece ser mais organizada que R_3.
- Os EPS produzidos pelas bactérias *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* apresentam estruturas com diferenças significantes, provavelmente responsáveis pelas diferenças em suas propriedades físico-químicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRAZEM, O., LEAL, J.A., PRIETO, A., JIMÉNEZ-BARBERO, J., BERNABÉ, M. Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachniotus verruculosus* and *A. ruber* **Carbohydrate Research,** Amsterdam v. 336, p. 325–328, 2001

AMEMURA, A.; HARADA, T. Strutural studies on the extracellular acidic polysaccharide from *Rhizobium trifolii* 4S, **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.115, p. 165-174, 1983.

AONO, R. The poly-α- and -β-1,4-glucuronic acid moiety of teichuronopeptidefrom the cell wall of the alkalophilic *Bacillus* strain C-125 **Biochemical Journal**, Londres, v.270, p.363-367,1990.

APPANNA, V.D.; PRESTON, C.M. Manganese elicits the synthesis of a novel exopolysaccharide in an artic *Rhizobium*. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v. 215, p. 79-82, 1987.

ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A.L.B.; CAMPOS-SÁS, L.F.; SANTOS JUNIOR, O.; VASCONCELOS, A.F.D.; CORRADI DA SILVA, M.L.; LEMOS, G.M.; CAMPANARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, São Paulo, v.33, p 895-899, 2010.

ASKER, M. M. S.; SHAWKY, B. T. Structural characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide isolated from *Brevibacterium otitidis* BTS 44. **Food Chemistry**, Barking, v.123, p.315–320, 2010.

BAE, Y.; OHA, I.; LEE, S.; YOO, S.H.; LEE, H.G. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans* **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v.42, p.10–13, 2008.

BAJAJ, I.B.; SURVASE, S.A.; SAUDAGAR S.P.; SINGHAL R.S. Gellan Gum: Fermentative Production, Downstream Processing and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, Lublin, v. 45, p.341–354, 2007.

BANIK, R.M. KANARI, B., UPADHYAY, S.N. Expolysaccharide of the gellan family: prospects and potencial. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Kanganam-Ku, v.16, p.407-414, 2000.

BECKER, E.D. **High resolution NMR: theory and chemical applications**. Academic Press, San Diego, 3ª ed. 2000.

BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, J.J. (Ed.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.97-118, 1998.

BLACK, G. E.; SNYDER, A. P.; HEROUX, K. S. Chemotaxonomic differentiation between the *Bacillus cereus* group and *Bacillus subtilis* by phospholipid extracts analyzed with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.28, p.187-199, 1997.

BLAKENEY, A.; HARRYS, P.; HENRY, R.; STONE, B. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 113, p. 291-299, 1983.

BOELS IC, VAN KRANENBURG R, HUGENHOLTZ J, KLEEREBEZEM M, DE VOS WM. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p. 723-732, 2001.

BONGIOVANI, R.A.M. **Características reológicas do exopolissacarídeo botriosferana produzido pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em três fontes de carbono: glucose, frutose e sacarose.** 2008. 112f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto.

BORGES, C.D.; BASTOS, C.P.; VENDRUSCOLO, C.T. Avaliação das características físicas e químicas de gomas xantanas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, p. 107-114, 2007.

BOULET, J.C.; WILLIAMS, P.; DOCO T.; A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v.69, p.79–85, 2007

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

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

BREEDVELD, M.W.; MILLER, K.J. Cyclic β-glucans of members of the family Rhizobiaceae. **Microbiology Review**, Oxford, v. 58, p. 145-161, 1994.

BRUICE, P.Y. **Química Organica**. Prentice Hall Brasil, 4ª Ed. 2006

BUENO, S.M.; GARCIA-CRUZ, C.H. The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. **Journal of Food Engineering**, Londres, v.50, p. 41-46, 2001.

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

CAMPBELL, D.; WHITE, J. R. Polymer Characterization: **Physical Techniques**. London: Chapman&Hall, p.50, 1989.

CAO, W.; LI, X-Q..; LIU, L.; WANG, M.; FAN, H.-T.; LI, C.; LV, Z.; WANG, X. MEI, Q. Structural analysis of water-soluble glucans from the root of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v.341, p.1870-1877, 2006.

CAPRON, I.; BRIGANDT, G.; MULLER, G. About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide **Polymers**, Amsterdam, v.38, p. 5289 5295, 1997

CARLSON, R.W.; REUHS, B.L.; FORSBERG, L.S.; KANNENBERG, E.L. Rhizobial cell surface carbohydrates: Their structures, biosynthesis, and functions IN: Goldenberg, J.B. **Genetics of bacterial polyssaccharides**. CRC press, p.53-90, 1999.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1503-1506, 2007.

ČERNÁ, M.; BARROS, A.S.; NUNES, A.; ROCHA, S.M.; DELGADILLO, I.; COPIKOVA, J.; COIMBRA, M.A. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analyse of polisaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v. 51; 383-389, 2003.

CHOULY, C.; COLQUHOUN, I.J.; JODELET, A.; YORK, G.; WALKER, G.C. NMR studies of succinoglycan repeating-unit octasaccharides from *Rhizoium meliloti* and *Agrobacterium radiobacter*. **International Journal of Biological Macromolecules,** Guildford, v.17,p. 357-363, 1995.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.131,p.209–217, 1984.

CORRADI DA SILVA, M.L.; FUKUDA, E.K.; VASCONCELOS, A.F.D.; DEKKER, R.F.H.; MATIAS, A.C.; MONTEIRO, N.K.; CARDOSO, M.S.; BARBOSA, A.M.; SILVEIRA, J.L.M.; SASSAKI, G.L.; CARBONERO, E.R. Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v.343, p.793–798, 2008.

CORRADI DA SILVA , M.L; IZELI, N.L.; MARTINEZ, P.F.; SILVA, I.R.; CONSTANTINO, C.J.L.; CARDOSO, M.L.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.;

SILVA, G.V.J. Purification and structural characterization of (1→3; 1→6)-β-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v. 61, p. 10-17, 2005.

COURTOIS, J.; SEGUIN, J.P.; ROBLOT, C.; HEYRAUD, A.; GEY, C.; DANTAS, L.; BARTOTIN, J.N.; COURTOIS, B. Exopolysaccharide production by the *Rhizobium meliloti* M5N1 CS strain. Location and quantitation of sites of *O*-acetylation. **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v.25, p. 7-12, 1994.

COVIELLO, T. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 119, p. 5-24, 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, São Paulo: 2006. Disponível em <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf>, acesso em 18. maio. 2011.

CUI, S.W. Structural Analysis of Polysaccharides in: CUI, S.W. **Food Carbohydrates, Chemistry, Physical Properties, and Applications,** CRC Press, 2005.

DATTA, C.; BASU, P. S. Production of Extracellular Polysaccharides by a *Rhizobiurn* Species from the Root Nodules of *Melilotus alba*. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v.19, p. 331-339, 1999.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Quimica Nova na Escola**, Araraquara, v. 7, p. 21-25, 1998.

DEGEEST, B.; MOZZI, F.; VUYST, L. Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.79 p. 161– 174, 2002.

DELBOGO, C.L.; GORIN, P.A.J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heterolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharide of *Anadenthera colubrine.* **Phytochemistry**, Reino Unido, p. 1207-1214, v.47, 1998.

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.

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

DUDMAN, W.F. Strutural Studies of the extracellular polysaccharides of Rhizobium japonicum strains 71A, CC708 and CB1795. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 66, p.9-23, 1978.

DUUS, J.Ø.; GOLFREDSEN, C.H.; BOCK, K. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitation. **Chemical Review,** Washington, v. 100, p. 4589-4614, 2000.

ELBOUTACHFAITI, R.; DELATTRE, C.; PETIT, E. MICHAUD, P. Polyglucuronic acids: Strutures, functions and degrading enzymes. **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v. 84, p. 1-13, 2011.

ERBING, B.; JANSSON P.-E.; WIDMALM, G.; NIMMICH W. Structure of the capsular polysaccharide from the Klebsiella K8 reference strain 1015. **Carbohydrate Research**, Amsterdam,v.273, p.197-205, 1995.

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

FARBER, E.J.; VAN HAASTER, D.J.; KAMERLING, J.P.; VLIEGENTHART, J.F.G. Characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* 8S containing an open chain nonionic acid. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, 5590-5598, 2002.

FERNANDES, P.B. Influence of Galactomannan on the Structure and Thermal Behaviour of Xanthan/Galactomannan Mixtures **Journal of Food Engineering**, Pullman, v.24, p.269-283 1994

FILISETTI-COZZI, T. M. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, Lisboa, v. 197, p. 157-162, 1991.

FOX, M. A.; WHITESELL, J. K. **Organic chemistry**. Boston: Jones and Bartlett, 1994.

FRINGANT, C.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. Physical properties of acetylated starchbased materials: relation with their molecular characteristics. **Polymers,** Amsterdam, v.37, p.2663-2673, 1996.

FUKUDA, E.K.; VASCONCELOS, A.F.D.; MATIAS, A.C.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; CORRADI DA SILVA, M.L. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias,** Londrina, v.30, p.117-134. 2009.

FUKUDA, M.; KOBATA, A.; **Glycobiology – A pratical approach**. IRL Press, Oxford University Press, Oxford, New York, p.15-16, 1993.

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

GARESH, S.; ADIN, I.; YARMOLINSKY, E.; KARPASAS, M. Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: molecular weight determination

and rheological properties. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v. 50, p. 183-189, 2002.

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,** Berlim, v.68, 319–329, 2008.

GONZAGA, M.L.C.; RICARDO, N.M.P.S.; HEATLEY, F.; SOARES, S.A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v.60, p.43-49, 2005.

GONZÁLEZ, J. E., YORK, G.M.; WALKER, G.C.**.** *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function, **Gene**, Londres, v.179, p.141-146, 1996.

GORIN, P. A. J. ; MAZUREK, M. ; SPENCER, J. F. T. . Proton Magnetic Resonance Spectra of Trichosporon aeuleatum Mannan and its Borate Complex anf Their Relationship to Chemical Structure. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 46, p. 2305-2310, 1968.

GORIN, P. A. J. ; SPENCER, J. F. T. . Structures of the L-Rhamno-D-mannan from Ceratocystis ulmi and D-Gluco-D-mannan from Ceratocystis brunnea. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 13, p. 339-349, 1970.

GORIN, P. A. J. . Preparation of alpha and beta Anomers of Various Isomeric Methyl *O*-D-Galactopyranosyl-D-galactopyranosides. Standards for Interpretation of C-13 NMR Spectra of D-Galactopyranans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 101, p. 13-20, 1983.

GRAY, J.S.S.; YANG, Y.B.; MONTGOMERY, R. Extracellular polysaccharide of *Erwinia chrysanthemi* A350 and ribotyping of *Erwinia chrysanthemi* spp. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.324, p.255–267, 2000.

GUENTAS, L., PHEULPIN, P., HEYRAUD, A., GEY, C., COURTOIS, B., COURTOIS, J. Production of a glucoclucurinan by a Rhizobia strain infecting alfalfa. Structure of the repeating unit. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guilford, v.27, p.269-277, 2000.

HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. **Journal of Chemical Society**, London, v. 107, p. 8-16, 1915.

HE, Y.; LIU, C.; CHEN, Y.; JI, A.; SHEN, Z.; XI, T.; YAO, Q. Isolation and Structural Characterization of a Novel Polysaccharide Prepared from *Arca subcrenata Lischke*. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** Londres, v. 104, p.111-116, 2007.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.180, p. 879-881, 1949.

HER, G.R.; GLAZEBROOK, J.; WALKER, G.C.; REINHOLD, V.N Strutural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium melioti* Strain Rm1021. **Carbohydrate Research,** Amsterdan, v.198, 305-312, 1989.

HEYRAUD, A.; COURTOIS, J.; DANTAS, L.; COLIN-MOREL, P.; COURTOIS, B. Strutural characterization and rheological properties of an extracellular glucuronan produced by a *Rhizobium meliloti* M5N1 mutant Strain. **Carbohydrate Reserch,** Amsterdam, v. 240, p.71-78, 1993.

HISAMATSU, M.; ABE, J.; AMEMURA, A.; HARADA, T. Structural elucidation succinoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by fragmentation with two special β-D-glycanases and methylation analysis. **Agriculture Biological Chemistry**, Tokio,v. 44, p. 1049-1055, 1980.

HISAMATSU, M. et al. Structural characterization of a new acidic exopolysaccharide and cyclic (1→2)-β-glucan produced by *Rhizobium huakuii* forming nodules on *Astragalus sinicus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 83, n. 4, p. 315-320, 1997.

JAMPEN, S.; BRITT, I.J.; TUNG, M.A. Gellan polymer solution properties: dilute and concentrated regimes. **Food Research International**, Amsterdam, v.33 p.579-586, 2000.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A pratical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Journal of the Chemical Society**. Stockholm, v. 48, p. 1-70, 1976.

JIN, H., LEE, N-K., SHIN, M-K., KIM, S-K., KAPLAN, D. L., LEE, J-W. Production of gellan gum by Sphingomonas paucimobilis NK2000 with soybean pomace. **Biochemical Engineering Journal**, Manchester, v. 16, p. 357-360, 2003.

JOHANSSON, L.; VIRKKI, L.; ANTTILA, H.; ESSELSTRÖM, H.; TUOMAINEN, P.; SONTAG-STROHM, T. Hydrolysis of β-glucan. **Food Chemistry**, Barking, v. 97, p. 71-19, 2005.

KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, p. 522-531, 2005.

KACURÁKOVÁ M.; SMITH, A.C.; GIDLEY, M.J.; WILSON, R.H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v.337, p.1147-1153, 2002.

KAISER, C.R.; RMN 2D: Detecção inversa e gradient de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova,** São Paulo, v.23, p.231-236, 2000.

KAJIWARA, K.; MIYAMOTO, T. Progress in Structural Characterization of Functional Polysaccharides. In M.F. Chaplin and J.F. Kennedy. **Polysaccharides - structural diversity and functional versatility.** 2nd ed. CRC Press. p. 1- 40, 2005.

KAMBOUROVA, M.; MANDEVA, R.; DIMOVA, D.; POLI, A.; NICOLAUS, B.; TOMMONARO, G. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v77, p338-343, 2009.

KANEDA, I.; KOBAYASHI, A.; MIYAZAWA, K.; YANAKI, Y. Double helix of *Agrobacterium tumefaciens* succinoglycan in filute solution. **Polymers,** Amsterdam, v. 43, p.1301-1305, 2002.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, Oxford, v. 59, p. 81-84, 1998.

KIM, B. S.; TAKEMASA, M.; NISHINARI, K. Synergistic Interaction of Xyloglucan and Xanthan Investigated by Rheology, Differential Scanning Calorimetry, and NMR. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, p. 1223-1230, 2006.

KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA B. Bacterial exopolysaccharide – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 47, p.103-117, 2007.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v.19, p.597–625, 2001.

LEIGH, J.A.; SIGNR, E.R.; WALKER, G.C. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodule. **Genetics,** Portland, v. 82, p. 6231-6235, 1985.

LEMERCINIER, X.; JONES, C. Full assignment of the 1H and 13C spectra and revision of the O-acetylation site of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumonia* Type 33F, a component of the current pneumococcal polysaccharide vaccine. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, V. 341, p.68-74, 2006.

LEVERY, S.B.; ZHAN, H.; LEE, C.C.; LEIGH J.A.; HAKOMORI, S. Strutural analysis of a second acidic exopolysaccharide of Rhizobium melioti that cam function

in alfafa root nodule invasion, **Carbohydrate Research**, Amsterdam v.210, p.339-347, 1991.

LIU, C.; LU, J.; LU, L.; LIU, Y.; WANG, F.; XIAO, M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. **Bioresource Technology**, Nova Iorque, v. 101, p.5528-5533, 2010.

LUVIELMO, M.M.; SCAMPARINI A.R.P. Xanthan gum: Production, recovery, properties and application. **Estudos Tecnológicos**, São Leopoldo, v. 5, p.50-67, 2009.

MAEDA, H.; ZHU, X.; SUZUKI, S.; SUZUKI,K.; KITAMURA, S. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. **Journal Agriculture and Food Chemistry** Nova Iorque, v. 52, p. 5533-5538, 2004.

MARGARITIS, A.; PACE, G.W. Microbial Polysaccharides in: **Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. H.W. Blanch, S. Drew, D.I.C. Wang, Pergamon Press, p.1005-1044, 1985.

MATULOVÁ, M.; TOFFANIN, R.; NAVARINI L.; GILLI, R.; PAOLETTI, S.; CESARO, A.; NMR analysis of succinoglycans from different microbial sources: partial assignment of their ^{1}H and ^{13}C NMR spectra and location of the succinate and the acetate groups. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v.265, p. 167-179, 1994.

MAUGERI FILHO, F. Produção de polissacarídeos. In: Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. **Biotecnologia Industrial**, Ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1ª ed., v. 3, p. 593, 2001.

MCNEIL, M.; DARVILL, J.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P.; VAN VEEN, R.; HOOYKAAS, P.; SCHILPEROORT, R.; DELL, A. The discernible, structural features of the acidic polysaccharides secreted by different *Rhizobium* species are the same. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 146, p.307-326, 1986.

MELO, I.R.; PIMENTEL, M.F.; LOPES, C.E.; CALAZANS1, G.M.T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis* **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p.45-51, 2008.

MELLO, R.P; MELLO, L.P.; PEREZ A. Identificação de cogumelos patogênicos por meio da coloração ácida periódico-Schiff. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v.53, p 519,528, 1955.

MEHVAR, R.; Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents, **Journal of Controlled Release,** West Lafayette, v.69, p. 1–25, 2000.

MOHAČEK-GROŠEV, V.; BOŽAC, R.; PIPPELS, G.J. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. **Spectrochimica Acta Part A,** Atlanta, v.57, p.2815–2829, 2001.

MORT, A.; UTILLE, J.-P.; TORRI, G.; PERLIN, A. High selectivtty tn the partial degradation of an extracellular polysacchartde of rhirohium japonicum with liquid hydrogen fluoride: a n.m.r.-spectroscopic study. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.121, p.221-232, 1983.

MULDOON, J.; SHASHKOV, A.S.; SENCHENKOVA, S.N.; TOMSHICH, S.V. KOMANDROVA, N.A.; ROMANENKO, L.A.; KNIREL, Y.A.; SAVAGE, A.V. Structure of an acidic polysaccharide from a marine bacterium Pseudoalteromonas distincta KMM 638 containing 5-acetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-7-formamido-L -glycero-L -manno-nonulosonic acid. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v. 330, p. 231-239, 2003

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

NAMPOOTHIRI, K. M., SINGHANIA, R. R., SABARINATH, C., PANDEY, A. Fermentative production of gellan using Sphingomonas paucimobilis. **Process Biochemistry**, Londres, v. 38, p. 1513-1519, 2003.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Princípio de Bioquímica**. 3ªed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NISHINARI, K.; TAKAHASHI, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, Göteborg, v. 8, p. 396–400, 2003.

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

PATEL, S.; KASOJU, N.; BORA, U.; GOYAL, A. Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate Pediococcus pentosaceus screened from biodiversity hot spot Assam. **Bioresource Technology,** Nova Iorque, v. 101, p. 6852–6855, 2010.

PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. In M.F. Chaplin and J.F. Kennedy. **Carbohydrate Analysis**: **A Practical Approach.** 2nded. New York: Oxford University Press. p. 73- 124, 1994.

PURWANDARIA, U.; SHAHA, N.P.; VASILJEVICA, T. Effects of exopolysaccharide-producing strains of Streptococcus thermophilus on technological and rheological properties of set-type yoghurt. **International Dairy Journal,** Barking, v.17, p.1344–1352, 2007.

RENAUD, M.; BELGACEM, M. N.; RINAUDO, M. Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solutions. **Polymers**, Amsterdam, v. 46, p. 12348-12358, 2005.

RIDOUT, M. J., BROWNSEY, G. J., YORK, G. M., WALKER, G. C.; MORRIS, V. J. Effect of *O*-acyl substituents on the functional behaviour of *Rhizobium meliloti* succinoglycan. **International Journal of Biologycal Macromolecule**, Guilford, v.20, p.1-7, 1997.

RINAUDO, M. Role of Substituents on the properties of some polysaccharide. **Biomacromolecules,** Whashington, v. 5, p.1155-1165, 2004.

RINAUDO, M.; VINCENDON, M. 13C NMR structural investigation of Scleroglucan, **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v.2, p.135-144, 1982.

ROOD, A.B.; DUNSTAN, D.E.; BOGER, D.V. Characterization of xanthan gum solution using dynamic light scattering and rheology. **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v. 42, p.159-174, 2000.

ROLLER, S., DEA, I. C. M. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 12, p. 2161-277, 1992.

RUTHES, A. C. ; KOMURA, D. L. ; CARBONERO, E. R. ; SASSAKI, G.L. ; GORIN, P.A.J. ; IACOMINI, M. . Structural characterization of the uncommon polysaccharides obtained from Peltigera canina photobiont Nostoc muscorum. **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v. 81, p. 29-34, 2010.

ŠANDULA, J.; KOGAN, G.; KACURÁKOVÁ, M.; MACHOVA, E. Microbial (1→3)-β-D-glucans, their preparation, phisico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v.38, p.247-253, 1999.

SANTOS, M., TEIXEIRA, J., RODRIGUES, A.. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using Leuxonostoc mesenteroides NRRL B521(f). **Biochemical Engineering Journal**, Manchester, v. 4, p. 177-188, 2000.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography, **Technical Association of the Pulp and Paper Industry**, Nova Iorque, v.37, p. 336–343,1954.

SCAMPARINI, A.R.P.; DRUZIAN, J.I.; MALDONADE, I.; MARIUZZO, D. New biopolymers produced by nitrogen fixing microorganisms for use in foods. In: K. NISHINARI (ed.), **Hydrocolloids. Part 1:Physical Chemistry and Industrial Application of Gels, Polysaccharides and Proteins**. Osaka, ElsevierScience B.V., p. 169-178, 2000.

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, N.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the antarctic fungus *Phoma herbarun* CCFEE5080. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.153, p.585-592, 2002

SERENO, N.M; HILL, S.E.; MITCHELL, J.R. Impact os the extrusion process on xanthan gum behavior. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 342, p.1333-1342, 2007.

SHIH, I.; CHEN, L.; WUB, J. Levan production using Bacillus subtilis natto cells immobilized on alginate. **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque,v.82, p.111–117, 2010.

SKOOG, D.A; HOLLER, F.J.; NIEMAN T.A. **Princípios de Análise Instrumental**; 4 ed, Bookman, Toronto; 2002

SLONEKER, J. H.; ORENTAS, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459. **Canadian Journal of Chemistry, Toronto,** v. 40, n. 11, p. 2066-2071, 1962.

STENEKES, R.J.H.; TALSMA, H.; HENNINK W.E. Formation of dextran hydrogels by crystallization **Biomaterials**, Guilford, v.22, p.1891-1898, 2001.

SIMSEK S.; MERT B.; CAMPANELLA O.H.; REUHS, B. Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v.76 p.320–324, 2009.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, 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.

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

SUTHERLAND, I.W. Polisaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v.38, p.319-328, 1999.

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

SYLVAIN, N., LACROIX, C. Gellan gum gel as entrapment matrix for high temperature fermentation processes: a rheological study. **Biotechnology Techniques**, Oxford, v.5, p. 351-356, 1999.

SYNYTSYA, A.; ČOPÍKOVÁ, J.; MATĚJKA, P.; MACHOVIČ, V. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v.54, p.97-106, 2003.

TAMAKI, T.; KONISHI, T.; FUKUTA, M.; TAKO, M. Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa* **Food Chemistry,** Barking, v.107, p.352–361, 2008.

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.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**; 8. ed, Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRIVENI, R.; SHAMALA T. R.; RASTOGI, N.K. Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. **Process Biochemistry,** Londres, v.36 p.787–795, 2001.

URAI, M.; YOSHIZAKI, H.; ANZAI, H.; OGIHARA, J.; IWABUCHI, N.; HARAYAMA, S.; SUNAIRI, M.; NAKAJIMA, M. Structural analysis of an acidic, fatty acid ester-bonded extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 342, p.933–942, 2007

VASCONCELOS, A. F. D.; MONTEIRO, N.K.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M.L. Three exopolysaccharides of the β-(1→6)-D-glucan type and a β - (1→3; 1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.14, p.2481-2485, 2008.

VIET, D.; BECK-CANDANEDO, S.; GRAY, D.G. Synthesis and characterization of blue dextrans **Carbohydrate Polymers,** Nova Iorque, v.74, p. 372–378, 2008.

VIJAYENDRA, S.V.N.; PALANIVEL, G.; MAHADEVAMMA, S.; THARANATHAN, R.N.; Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc sp*. CFR 2181 isolated from *dahi*, an Indian traditional lactic fermented milk product. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v.72, p.300-307, 2008.

VIEBKE, C.; WILLIAMS, P.A.; Determination of molecular mass distribution of k-carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fraction. **Food Hydrocolloids,** Wrexham, v.12, p.265-270, 2000.

VINCENT, S.,J.,F.; FABER, E., J.; NEESER, J.R.; STINGELE, F.; KAMERLING, J.P. Struture and properties of exopolysaccharide produced by Streptococcus macedonicus Sc 136. **Glycobiology**, Oxford, v. 11, p. 131-139, 2001

VUYST, L.D.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharide from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews,** Lausanne, v.23, p.153-177, 1999.

VUYST, L; ZAMFIRA, M.; MOZZIA, F.; ADRIANYA, T.; MARSHALLD, V.; DEGEEST, B.; VANINGELGEM F. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks **International Dairy Journal,** Barking, v.13, p. 707–717, 2003.

WALLEY, F.L.; STEPHENS J.H. RHIZOBIA in: Dekker, M. **Encyclopedia of Pest**, 1ª ed, CRC Press, 2002

WENDT, R. **Estudo da produção de levana através de *Zymomonas mobilis***. Campinas, 2001. 176p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

WERNER, D.; NEWTON, W.E., Eds., *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and Environment*, v.4, Book series *Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress*, Springer, Dordrecht, 2005.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetilation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, Nova Iorque, v.2, p. 211-215, 1963.

WOLKERS, W.F.; OLIVER, A.E; TABLIN, F.;CROWE, J.H. A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v.339, p.1077-1085, 2004.

YANG, L., ZHANG, L.-M, Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v.76, p.349–361, 2009.

YE , L.; ZHANG, J.; YANG, Y. ZHOU, S. LIU, F.; TANG, Q. DU, X.; CHEN, H.; PAN, Y. Structural characterisation of a heteropolysaccharide by NMR spectra, **Food Chemistry**, Barking, v.112, p.962–966, 2009.

YORK, G.M.; WALKER G,C. The Succinyl and Acetyl Modifications of Succinoglycan Influence Susceptibility of Succinoglycan to Cleavage by the *Rhizobium meliloti* Glycanases ExoK and ExoH **Journal of Bacteriology**, Nova Iorque, v.180, p.4184-4191, 1998.

ZDOROVENKO, E. L.; VARBANETS, L. D.; ZATONSKY, G. V.; ZDOROVENKO, G. M.; SHASHKOV, S. A.; KNIREL, Y. A. Isolation and structure elucidation of two different polysaccharides from the lipopolysaccharide of Rahnella aquatilis 33071^{T} **Carbohydrate Research**, Amsterdan, v. 344, p. 1259–1262, 2009.

ZIERER M.S.; MOURÃO, P.A.S. A wide diversity of sulfated polysaccharide are syntesized by different species of marine sponge. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v.328, p.209-216, 2000.

ZHAO, L., CHEN, Y., REN, S., HAN, Y., CHENG, H. Studies on the chemical structure and antitumor activity of an exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613 **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v.345, p.637-643, 2010.

ZHAO, C.; LI, M.; LUO, Y.; WU, W. Isolation and structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from fuzi, *Aconitum carmichaeli*. **Carbohydrate Research,** Amsterdam, v.341, p. 485-491, 2006.

ZHAO, G.; KAN, J.; LI, Z.; CHEN, Z. Characterization and immunostimulatory activity of an (1→6)-α-D-glucan from the root of *Ipomoea batatas*. **International Immunopharmacology**, Omaha, v.5, p.1436-1445, 2005.

ZHBANKOV , R.G.; ANDRIANOVA, V.M.; MARCHEWKAB, M.K. Fourier transform IR and Raman spectroscopy and structure of carbohydrates. **Journal of Molecular Structure**, Coimbra, v.436-437, p. 637-654, 1997.

ZOHURIAAN, M.J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, Shrewsbury, v. 23, p. 575-579, 2004.

Anexos

sbqedit@iq.usp.br para mim
mostrar detalhes 6 mai (3 dias atrás)

REF.: tmp tmp_8151

Prezado Prof. CORRADI DA SILVA, MARIA DE LOURDES

Obrigado por submeter seu manuscrito "Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp." para publicação na Química Nova, QN.

O NÚMERO TEMPORÁRIO é: tmp_8151 tmp.

Assim que o seu arquivo PDF for verificado, o seu manuscrito será inserido no sistema, e você receberá um outro e-mail com o NÚMERO DE REFERÊNCIA, confirmando assim a submissão.

Caso você tenha alguma outra dúvida a respeito desta submissão, por favor, entre em contato com a Gerente Editorial da QN no e-mail: sbqedit@iq.usp.br.

Atenciosamente,

Pricila Gil
SBQ - gerente editorial
Caixa Postal: 26037
05513-970 São Paulo - SP

Tel.: +55.11.30322299
Fax.: +55.11.38143602