

**ANA FLORA DALBERTO VASCONCELOS**

**$\beta$ -GLUCANAS DE ISOLADOS FÚNGICOS DO  
GÊNERO *BOTRYOSPHAERIA*: PRODUÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
ANTICOAGULANTE**



Rio Claro

2009

ANA FLORA DALBERTO VASCONCELOS

$\beta$ -GLUCANAS DE ISOLADOS FÚNGICOS DO GÊNERO  
*BOTRYOSPHERA*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E  
ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

**Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva**

**Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes Corradi da Silva**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

Rio Claro  
2009

**589.2 Vasconcelos, Ana Flora Dalberto**  
**V331g       $\beta$ -Glucanas de isolados fúngicos do gênero *Botryosphaeria***  
**: produção, caracterização química e atividade anticoagulante**  
**/ Ana Flora Vasconcelos. - Rio Claro : [s.n.], 2009**  
**126 f. : il., gráfs., tabs., figs.**  
**Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,**  
**Instituto de Biociências de Rio Claro**  
**Orientador: Roberto da Silva**  
**Co-orientador: Maria de Lourdes Corradi da Silva**  
**1. Fungos. 2. Carboidratos. 3. Exopolissacarídeos. 4.**  
**Ressonância magnética de carbono 13. 5. Sulfatação.**  
**I. Título.**

**Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP**  
**Campus de Rio Claro/SP**

ANA FLORA DALBERTO VASCONCELOS

$\beta$ -GLUCANAS DE ISOLADOS FÚNGICOS DO GÊNERO  
*BOTRYOSPHERIA*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E  
ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas (Microbiologia Aplicada)

**Comissão Examinadora:**

Prof Dr Roberto da Silva

Profa Dra Gabriela Alves Macêdo

Profa Dra Maria Inês Rezende

Prof Dr Jonas Contiero

Profa Dra Eleonora Cano Carmona

Rio Claro, 06 de fevereiro de 2009.

DEUS, o principal motivador da minha vida

“...Tudo é do Pai, toda a honra e a glória. É dele a VITÓRIA alcançada em minha vida....”

*Pe Fabio de Melo*

Para a minha querida mãe **MARIA HELENA**, minha maior incentivadora, sempre presente com suas orações. As lições de vida dessa mulher batalhadora, professora atuante e mãe carinhosa foram os estímulos principais para que mais esta etapa da minha vida fosse concretizada.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente na minha vida.

À Nossa Senhora, que sempre roga a Deus por seus filhos.

Ao meu pai Laphaette (*in memorian*), a minha mãe Maria Helena, aos meus irmãos Aline, Oswaldo e Fabiana, a querida Geni, minha cunhada Daniela, meu sobrinho Felipe (a tia Nana ama você...) e todos mais da minha PRECIOSA FAMILIA (de primeiro a último grau!!), pela paciência, auxílio e incentivo em todos os momentos. Sem o apoio da família não somos nada!

Ao prof Dr. Roberto da Silva, por ter gentilmente aceitado me orientar e dado liberdade para que este trabalho fosse desenvolvido.

À prof Dra Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva, com quem também tive o privilégio de compartilhar esse trabalho; obrigada pelos ensinamentos, pela confiança, dedicação, amizade, pelo incentivo e também pelas broncas, que me ajudaram a crescer. Este trabalho não teria sido realizado sem o seu apoio incondicional.

À prof Dra Aneli de Melo Barbosa, que primeiro me orientou e também sempre incentivou a ter uma carreira científica.

À amiga e técnica de laboratório Marilsa de Stefani Cardoso, pelo ombro amigo sempre presente, conselhos certos e pelo auxílio precioso durante todos os momentos desse trabalho.

Ao amigo e aluno Nilson K. Monteiro, que me auxiliou durante todo este trabalho, sempre pronto a colocar as coisas para funcionar, principalmente o computador, quando eu não sabia mais o que fazer com ele. A gente trabalhava muito, mas também se divertia né, Nilsinho?

Ao amigo e aluno Osvaldo dos Santos Júnior, pelo auxílio em toda a parte da sulfatação e por tornar o ambiente do laboratório muito mais alegre e divertido, mas sem perder a compostura, nunca se estressando com nada né Junior?

Aos alunos e amigos do laboratório de química de Carboidratos do Depto de Física, Química e Biologia da FCT-UNESP-Presidente Prudente, Gabriel, Luciana e Andreza, pela convivência, ajuda e apoio sempre que necessários. Um agradecimento muito especial ao Gabriel pelo auxílio com a digitação das referências.

À minha grande amiga Maria Inês, pelo carinho, sugestões e apoio sempre.

Aos amigos do Curso de pós Graduação em Microbiologia Aplicada, em especial Adriana Campos, Adriana Knob, Cintia, Isabel, Mariana, Roberta e Sueli, pela amizade, carinho e companheirismo em todos os momentos

Aos colegas do Depto de Física, Química e Biologia da FCT–UNESP– Presidente Prudente, em especial prof Dr Celso Xavier Cardoso, prof Dra Ana Maria Pires, prof Dra Ana Maria Osório e as funcionárias Juvanir R. de Mello e Ana Maria Dundi, pela convivência, amizade e auxílio sempre presentes.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, na pessoa da prof Dra Sandra M. Franchetti pela presteza e auxílio sempre que necessários.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada que auxiliaram com seus ensinamentos para a minha formação.

Ao prof Dr. Paulo Mourão, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana Sá Pereira, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anna Maria Tovar e doutoranda Bianca Glauser do Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela utilização do laboratório assim como pelos ensinamentos, sugestões e auxílio nos testes para os testes de determinação de atividade de trombina.

À todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta tese e para meu amadurecimento científico.

À CAPES pelo apoio financeiro.



## **Agradecimento Especial**

Ao meu avô materno, JOSÉ PACÍFICO DALBERTO (*in memoriam*), um homem simples, semi analfabeto, mas que sempre soube dar valor ao conhecimento, passando isso aos filhos e netos. Se não fosse a coragem dele em sair do campo e se aventurar na cidade para que seus filhos tivessem direito ao estudo, talvez hoje eu não estivesse terminando essa etapa acadêmica tão importante para a minha vida.

## RESUMO

Exopolissacarídeos do tipo  $\beta$ -glucanas são polímeros produzidos por uma grande variedade de microrganismos e podem possuir diferentes propriedades físicas, químicas e aspectos estruturais. Esses biopolímeros apresentam atividades biológicas interessantes (antitumor, antiviral, anticoagulante) e aplicações comerciais como produtos em alimentos, cosméticos e farmacêuticos. Entretanto, para a aplicação dessas moléculas, é necessário primeiramente o conhecimento de suas estruturas químicas. Assim, o objetivo deste trabalho foi a produção, caracterização química de quatro exopolissacarídeos ( $\text{EPS}_{\text{GRAVIOLA}}$ ,  $\text{EPS}_{\text{MANGA}}$ ,  $\text{EPS}_{\text{PINHA}}$  e  $\text{EPS}_{\text{LARANJA}}$ ) de isolados de *Botryosphaeria* obtidos de frutas tropicais em decomposição e crescidos em sacarose como única fonte de carbono, determinando o melhor EPS para realizar testes de atividade anticoagulante. A homogeneidade de cada EPS foi determinada por cromatografia de filtração em gel, os quais eluíram como um único pico. Hidrólise ácida total e análise por HPAEC/PAD mostrou glucose como constituinte básico. Dados de metilação e RMN de  $^{13}\text{C}$  indicaram que os  $\text{EPS}_{\text{MANGA}}$ ,  $\text{EPS}_{\text{PINHA}}$  e  $\text{EPS}_{\text{LARANJA}}$  são glucanas lineares unidas por ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow6)$  e o  $\text{EPS}_{\text{GRAVIOLA}}$  é uma glucana com ligações  $\beta(1\rightarrow3)$  e com ramificações em C-6 de resíduos glucopiranosídicos. O espectro de FT-IR mostrou uma banda em  $891\text{ cm}^{-1}$ , e a espectroscopia de  $^{13}\text{C}$  NMR mostrou que todas as ligações eram do tipo  $\beta$ . Estudos realizados com o corante Vermelho Congo indicaram que os EPS possuem conformação em tripla hélice. O  $\text{EPS}_{\text{LARANJA}}$ , uma  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana, foi submetido a sulfatação visando induzir a atividade anticoagulante e melhorar a solubilidade da molécula em solução, importante para a atividade biológica. Espectros de FT-IR mostraram bandas em  $808$  and  $1252\text{ cm}^{-1}$ , indicando a entrada dos grupos sulfato e as análises de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostraram que estes grupos foram inseridos principalmente em C-4 na  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana. O D.S. encontrado para a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada foi de 0,95. Os testes APTT e TT para a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada indicaram atividade anticoagulante *in vitro*, que mostrou ser dose-dependente. Os resultados da inibição da trombina pela ação da antitrombina mostraram que a atividade anticoagulante da  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana sulfatada pode ser devido a ativação da antitrombina pelo polissacarídeo sulfatado.

Palavras-chaves: exopolissacarídeo. *Botryosphaeria*.  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana fúngica.  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-glucana fúngica. ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ . sulfatação. atividade anticoagulante.

## ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) as  $\beta$ -glucans are polymers produced by a great variety of microorganisms and can possess different physical and chemical properties, and structural features. These biopolymers having interesting biological activities (anti-tumor, anti-viral, anticoagulant), and commercial applications in foods, cosmetics and pharmaceutical products. However, for the applications of these macromolecules, it is first necessary to understand their chemical structures. Therefore the goal of that study was the production, chemical characterization and biological activity of four exopolysaccharides (EPS<sub>GRAVIOLA</sub>, EPS<sub>MANGO</sub>, EPS<sub>PINHA</sub> and EPS<sub>ORANGE</sub>) obtained from *Botryosphaeria* strains isolated from rotting tropical fruit grown on sucrose as carbon and the best EPS was used for the anticoagulant activity. The homogeneity of each EPS was determined by gel filtration chromatography, which was eluted as a single peak. Total acid hydrolysis and HPAEC/PAD analysis of each EPS yielded only glucose. Data from methylation analysis and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy indicated that the EPS<sub>MANGO</sub>, EPS<sub>PINHA</sub> and EPS<sub>ORANGE</sub> consisted of a linear chain of (1-6)-linked glucopyranosyl residues and EPS<sub>GRAVIOLA</sub> consisted of a main chain of glucopyranosyl (1-3) linkages substituted at O-6. FTIR spectra showed one band at 891 cm<sup>-1</sup>, and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy showed that all glucosidic linkages were of the  $\beta$ -configuration. Dye-inclusion studies with Congo Red indicated that each EPS existed in a triple-helix conformational state. The EPS<sub>ORANGE</sub>, a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan was submitted to a sulfation to induce anticoagulant activity and also to make this EPS more soluble, which is in favor to its biological action. The FT-IR spectrum showed bands at 808 and 1252 cm<sup>-1</sup> indicating insertion of sulfonyl groups and the <sup>13</sup>C NMR analysis showed that the sulfonyl groups were inserted mainly in C-4 of the  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan. The D.S. of sulfated  $\beta$ -(1-6)-D-glucan was 0.95. Tests of APTT and TT for the sulfated  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan indicated a anticoagulant activity *in vitro*, which showed to be dose-dependent. The results of thrombin inhibition by antithrombin showed that the anticoagulant activity of sulfated  $\beta$ -(1-6)-D-glucan was probably due to the activated antithrombin by sulfated polysaccharide.

**Keywords:** exopolysaccharide, *Botryosphaeria*, fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan; fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan, <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. sulfation, anticoagulant activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tipos de conformação adotados por cadeias de polissacarídeos.....	28
Figura 2. Estrutura química do exopolissacarídeo produzido por <i>B. rhodina</i> MAMB-05 em frutose como fonte de carbono .....	47
Figura 3. Esquema representativo do princípio do teste de tempo de protrombina.....	64
Figura 4. Esquema representativo do princípio do teste de tempo parcial de tromboplastina ativada.....	65
Figura 5. Cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL -4B dos EPS produzidos pelos quatro isolados de <i>B. rhodina</i> em sacarose como única fonte de carbono.....	74
Figura 6. Análise dos hidrolisados de EPS produzidos pelos diferentes isolados por HPAEC/PAD.....	77
Figura 7. Análise de padrões de açúcares neutros por HPAEC/PAD.....	78
Figura 8. Espectros de infravermelho acoplados ao transformador Fourier (região de 4000 a 500 cm <sup>-1</sup> ) dos EPS antes e após a metilação.....	80
Figura 9. Espectro de infravermelho acoplado ao transformador Fourier (região de 1800 a 600 cm <sup>-1</sup> ) dos EPS produzidos pelos isolados de <i>Botryosphaeria</i> .....	83
Figura 10. Espectros de RMN de <sup>13</sup> C dos EPS produzidos pelos isolados.....	85
Figura 11. Estruturas prováveis da β-D(1→3; 1→6)-glucana e das da β-D(1→6)-glucanas.....	87
Figura 12. Análise conformacional dos EPS produzidos pelos isolados de <i>Botryosphaeria</i> de acordo com a mudança de absorção máxima do complexo vermelho congo-EPS, em várias concentrações de NaOH.....	91
Figura 13. Espectroscopia de Absorção UV/Vis referentes a β-D-(1→6)-glucana e β-D-(1→6)-glucana sulfatada.....	94
Figura 14. Espectros de FT-IR (região de 4000 a 500 cm <sup>-1</sup> ) da β-D-(1→6)-glucana, antes e após sulfatação.....	95

Figura 15. Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ para a $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{6)}$ -glucana e $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{6)}$ -glucana sulfatada.....	97
Figura 16. Dependência da concentração das $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{6)}$ glucana, $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{6)}$ glucana sulfatada e heparina para a inativação da trombina na presença de plasma humano (a) ou na presença de antitrombina purificada (b).....	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ensaio analítico para a formação do complexo CR/EPS.....	60
Tabela 2: Concentrações finais das amostras e do padrão nos diferentes ensaios de atividade anticoagulante.....	63
Tabela 3: Peso seco (liofilizado) e quantificações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas dos EPS produzidos pelos isolados do gênero <i>Botryosphaeria</i> obtidos de diferentes fontes vegetais (laranja, manga, graviola, pinha) crescidos em sacarose comercial como única fonte de carbono.....	71
Tabela 4: Resultados da análise por cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na análise de metilação dos EPS produzidos pelos isolados de <i>Botryosphaeria</i> obtidos de graviola, manga, pinha e laranja.....	81
Tabela 5: Atividade anticoagulante de plasma normal humano na presença da $\beta$ -D-(1→6) glucana e da $\beta$ -D-(1→6) glucana sulfatada e heparina em diferentes concentrações, determinada pelos testes clássicos de atividade anticoagulante APTT (Tempo de tromboplastina parcial ativada, TT (tempo de trombina) e PT (Tempo de protrombina)...	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  – Beta

*B. rhodina* – *Botryosphaeria rhodina*

B.R.M. - Modificadores de resposta biológica (Biological Response Modifier)

B.S.A. - Soro albumina bovina

BaSO<sub>4</sub> – cloreto de bário

BDA - Batata-dextrose-ágar

C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub> - ácido elágico

CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio

DMS – sulfato de dimetila

DMSO - dimetilsulfóxido

EPS – exopolissacarídeo

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

H.P.A.E.C. – high performace anionic exchange chromatography

PAD (pulsed amperometric detection)- detecção por amperometria pulsada

GC-MS (gas chromatography mass spectroscopy) - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

$\lambda_{MAX}$  - Comprimento de onda máximo

RMN – Ressonância magnética nuclear

<sup>13</sup>C – Carbono 13

TCA - Ácido tricloroacético

TFA – Ácido trifluoroacético

U.I. – Unidades internacionais

I - Fibrinogênio

II – Protrombina

AT - Antitrombina

III - Fator tecidual ou tromboplastina

X - Fator Stuart-Prower

APTT - Tempo de tromboplastina parcial ativada

TT - Tempo de trombina

PT - Tempo de protrombina

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
3.1 Porque os microrganismos produzem exopolissacarídeos?.....	22
3.2 Caracterização química dos exopolissacarídeos.....	24
3.3. Glucanas fúngicas.....	29
3.4. Importância biotecnológica dos exopolissacarídeos.....	33
3.4.1 Aplicações biológicas das glucanas fúngicas.....	38
3.5. Sulfatação como procedimento de mudança química em glucanas fúngicas: vantagens para a atividade biológica.....	43
3.6. Fungos do gênero <i>Botryosphaeria</i> .....	45
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
4.1. Reagentes.....	49
4.2. Equipamentos.....	49
4.3. Microrganismos.....	49
4.3.1. Manutenção dos microrganismos.....	50
4.4. Cultivos microbianos para obtenção dos exopolissacarídeos.....	51
4.4.1. Preparo do inóculo.....	51
4.4.2. Produção dos exopolissacarídeos (EPS).....	51



4.4.3.	Interrupção dos cultivos e recuperação dos EPS.....	52
4.5.	Métodos analíticos.....	52
4.5.1.	Determinação dos açúcares totais.....	52
4.5.2.	Determinação dos açúcares redutores.....	53
4.5.3.	Determinação de proteínas.....	53
4.5.4.	Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sepharose CL-4B....	54
4.5.5.	Hidrólise ácida total.....	54
4.5.6.	Análise da composição monossacarídica dos EPS por cromatografia líquida de alta pressão em troca aniônica (HPAEC).....	55
4.5.7.	Espectroscopia no infravermelho acoplado ao transformador Fourier (FT-IR).....	55
4.5.8.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN- <sup>13</sup> C).....	56
4.5.9.	Metilação dos EPS produzidos pelos diferentes isolados do gênero <i>Botryosphaeria</i> .....	56
4.5.10	Hidrólise, redução e acetilação dos polissacarídeos metilados.....	58
4.5.11	Análise da estrutura conformacional dos EPS.....	59
4.6.	Derivatização Química por Sulfatação do EPS <sub>LARANJA</sub> .....	60
4.6.1.	Determinação do grau de substituição (D.S.).....	61
4.7.	Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> .....	62
4.7.1.	Teste de protrombina (PT).....	63
4.7.2.	Teste de tromboplastina parcial ativada (APTT).....	64
4.7.3.	Teste de trombina (TT).....	66

4.7.4.	Inibição da trombina (IIa) pela antitrombina (AT).....	66
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
5.1.	Produção e quantificação dos EPS pelos diferentes isolados do gênero <i>Botryosphaeria</i> obtidos de espécimes vegetais (graviola, manga pinha e laranja).....	68
5.2.	Análise de homogeneidade dos EPS produzidos pelos diferentes isolados através de cromatografia de exclusão molecular.....	72
5.3.	Caracterização química dos exopolissacarídeos obtidos dos isolados do gênero <i>Botryosphaeria</i> .....	76
5.4.	Análise conformacional dos exopolissacarídeos produzidos pelos diferentes isolados de botriosferáceos.....	89
5.5.	Sulfatação e atividade anticoagulante do EPS <sub>LARANJA</sub> , uma $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana.....	92
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO.....</b>		<b>123</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A grande maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos. Estas moléculas são polímeros de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, formadas a partir da eliminação de uma molécula de água entre o grupo hidroxila hemiacetal de um resíduo e um grupo hidroxila primário ou secundário de outro resíduo adjacente. Podem ser constituídos por números variáveis de resíduos em uma estrutura linear, ramificada ou ocasionalmente cíclica e sua massa molecular pode variar de milhares a milhões de Daltons, diferindo em relação a suas unidades monossacarídicas, no comprimento das cadeias, no tipo de ligação glicosídica e no grau de ramificação. Esses polímeros podem ser encontrados como homopolissacarídeos, quando constituídos por um único tipo de monossacarídeo, ou como heteropolissacarídeos, quando em sua estrutura estão presentes duas ou mais diferentes unidades repetidas.

Dentre os homopolímeros alguns, tais como amido e glicogênio, servem como fonte de energia para as atividades metabólicas celulares; outros como celulose e quitina formam as paredes celulares vegetais e exoesqueletos de animais, respectivamente. Os heteropolissacarídeos podem fornecer suporte extracelular, como o peptidoglicano de bactérias, ou as glicosaminoglicanas da matriz dos tecidos animais.

Há na natureza microrganismos fitopatogênicos que secretam polissacarídeos, denominados exopolissacarídeos, para auxiliar no processo de infecção na planta. Esses polímeros são constituídos geralmente por unidades glucosídicas em ligação alfa ou beta, sendo as betas glucanas a forma predominante encontrada em fungos.

Polissacarídeos microbianos apresentam características químicas e funções biológicas interessantes que permitem a sua aplicação em diferentes setores industriais. A atividade antigênica de algumas dessas moléculas tem sido utilizada com sucesso pela indústria farmacêutica para formulação de vacinas;

outras, quando em soluções, são utilizadas na indústria de alimentos como estabilizantes, emulsificantes ou gelificantes, apresentando, viscoelasticidade, aderência e bio-compatibilidade (PAULSEN, 2002). Também podem ser aplicadas na indústria petrolífera, auxiliando na floculação de materiais e formação de biofilmes. Entretanto, para que essas moléculas possam ser aplicadas há necessidade que sejam seguramente homogêneas e suas estruturas químicas determinadas.

De acordo com BOHN; BeMILLER (1995) algumas glucanas fúngicas fazem parte do grupo modificador da resposta biológica (BRM) e têm sido utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer, potencializando a resposta imunológica do hospedeiro; ainda podem apresentar outras atividades importantes, como antiviral, antimutagênica e anticoagulante.  $\beta$ -glucanas de elevada massa molecular, insolúveis em soluções aquosas neutras, podem ter essa condição revertida com a inserção de grupos químicos tais como carboxila e sulfato. Essa modificação gera não somente moléculas mais solúveis, mas principalmente com atividade biológica.

Portanto, devido à destacada importância dos polissacarídeos, principalmente aqueles de origem microbiana, o presente estudo teve como propósito a produção e caracterização química de exopolissacarídeos obtidos de isolados do gênero *Botryosphaeria*, coletados de frutas tropicais em decomposição. Acreditando na futura aplicação biotecnológica, o exopolissacarídeo do melhor produtor foi quimicamente modificado por sulfatação e analisado como anticoagulante. Tem sido observado que o uso prolongado da heparina, o anticoagulante mais utilizado, pode apresentar alguns problemas relacionados com sangramento e por isso a obtenção de novas moléculas com esta função biológica se faz necessária.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

— Produzir, purificar e caracterizar estruturalmente exopolissacarídeos de diferentes isolados do gênero *Botryosphaeria* coletados de frutas tropicais e realizar testes de atividade biológica com o exopolissacarídeo modificado, obtido do melhor produtor.

### 2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar a produção de exopolissacarídeos (EPS) dos diferentes isolados cultivados em sacarose comercial como única fonte de carbono;
- Purificar os EPS até a homogeneidade por cromatografia de filtração em gel;
- Efetuar hidrólise ácida dos EPS para determinação de seus constituintes monossacarídicos;
- Determinar a configuração das ligações glicosídicas dos EPS por FTIR e RMN-<sup>13</sup>C;
- Realizar análise de metilação acoplada à espectrometria de massa para determinar a posição das ligações glicosídicas;
- Analisar a conformação estrutural dos EPS pelo método do Vermelho Congo;
- Encontrar as condições ideais para a sulfatação do EPS do melhor produtor;
- Quantificar o grau de sulfatação por método turbidimétrico e por hidrólise do EPS sulfatado;
- Determinar a atividade anticoagulante do EPS sulfatado e não sulfatado por ensaios clássicos de coagulação, utilizando a heparina com referência

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Por que os microrganismos produzem exopolissacarídeos?

Entre os microrganismos, a habilidade para a produção de polissacarídeos é encontrada em diferentes espécies, tanto procariotos (bactérias e cianobactérias), quanto eucariotos, tais como fungos e leveduras (SUTHERLAND, 2001). Como todo carboidrato, a função principal de um polissacarídeo é servir como fonte de reserva energética e de carbono para os processos metabólicos, mas muitos também participam da formação de estruturas celulares ou facilitam o contato entre organismos.

Na natureza, algumas espécies microbianas são capazes de secretar polissacarídeos para o meio ambiente, que podem, por exemplo, auxiliar na aderência de um microrganismo patogênico durante a infecção em uma planta ou animal (SUTHERLAND, 1998). Além disso, os exopolissacarídeos (EPS) também podem proteger contra ataques de organismos, como bacteriófagos ou protozoários ou evitar desidratação das estruturas celulares (SUTHERLAND, 1998; RUAS-MADIEDO, HUGENHOLTZ, ZOON, 2002).

Exopolissacarídeos microbianos podem ser a base para a formação de biofilmes onde diferentes comunidades microbianas, tanto procarióticas quanto eucarióticas se alojam para se fixar sob superfícies sólidas (SUTHERLAND, 1998; MATA et al., 2008). As bactérias vivem predominantemente associadas dessa maneira, o que pode ser visto como uma estratégia ecológica contra o estresse químico e físico gerado pelas mudanças ambientais causadas pelo homem. Biofilmes marinhos bacterianos também podem servir para a sustentação de outros organismos, como pequenos invertebrados marinhos (ORTEGA-MORALES et al., 2007).

Polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos ligninolíticos desempenham papel importante no processo de degradação de xenobióticos, uma vez que imobilizam as enzimas extracelulares. O gel formado por estes biopolímeros

impede a desidratação da hifa e permite adesão entre as células ou a adesão destas às superfícies, além de selecionar moléculas do meio (BARBOSA et al.,2004).

Para que a associação ecológica micorrízica entre uma planta e um fungo possa ocorrer, é preciso uma interação específica entre o micobionte (fungo) e as células hospedeiras. Observações citológicas têm mostrado a presença de material fibrilar contendo polissacarídeos e glicoproteínas ligando o fungo às células. O estudo de produção de polissacarídeos solúveis em água de micélio micorrízico foi realizado com 22 espécies, sendo que seis mostraram-se capazes de produzir polissacarídeos extracelulares (OSAKU et al., 2002).

*Sinorhizobium meliloti* é uma bactéria gram negativa do solo, que provoca nódulos de fixação de nitrogênio em raízes de plantas leguminosas. Estudos demonstraram que durante a fixação na célula hospedeira para o processo simbiótico, este microrganismo secreta diferentes substâncias, e entre elas um exopolissacarídeo denominado de succinoglucano (SHARYPOVA et al., 2006).

EPS de microrganismos nativos de regiões geladas podem servir como uma estratégia evolutiva para manutenção desses organismos no ambiente, pois parecem conferir proteção contra baixas temperaturas (SELBMAN et al, 2002). De acordo com Nevot e colaboradores (2006) bactérias do gênero *Pseudoalteromonas*, encontradas na Antártida, mostraram capacidade de produção de grandes quantidades de EPS no ambiente.

Em ambientes salinos, é possível encontrar microrganismos que produzem grandes quantidade de EPS, como bactérias do gênero *Halomonas* (MATA et al., 2006) e cianobactérias isoladas de atol marinho na região da Polinésia Francesa (RICHERT et al.,2005), que provavelmente devem tornar possível o desenvolvimento dos microrganismos nessas condições. Nos dois casos os pesquisadores observaram também a presença de proteínas ligadas aos EPS.

Os exemplos acima demonstram a importância desse tipo de molécula para o desenvolvimento microbiano nos ambientes. Pode-se dizer que na natureza, a biossíntese de exopolissacarídeos está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo.

A produção de EPS pelos microrganismos é extremamente interessante do ponto de vista biotecnológico, pois essas moléculas costumam ser produzidas em condições extremas, para manter a presença do microrganismo em um determinado ambiente. Sendo assim, elas podem possuir características químicas e físicas que permitem suas aplicações em diferentes processos industriais.

### **3.2. Caracterização química dos exopolissacarídeos**

Embora alguns EPS tenham sido descritos, nem todos foram ainda corretamente caracterizados. Conseqüentemente, a diversidade química e propriedades funcionais são pouco entendidas. Como essas moléculas ocorrem na natureza como misturas heterogêneas dos componentes celulares ou como secreções, faz-se necessário primeiro isolar, purificar e caracterizar estruturalmente estes polissacarídeos (CORRADI DA SILVA et al., 2006), para posterior aplicação nas diferentes áreas.

As características que devem ser determinadas são principalmente os tipos de unidades monossacarídicas, o número de resíduos por molécula, tipo de configuração dos resíduos (D ou L), posições das ligações glicosídicas entre resíduos e a configuração anomérica das ligações glicosídicas. Diferentes técnicas são utilizadas, sejam sozinhas ou em conjunto, para determinação dessas características, hidrólise ácida ou enzimática, metilação, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, cromatografia gasosa, polarimetria, etc (PAZUR, 1994).

Para investigar propriedades e reações desses biopolímeros, é primeiro necessário produzir, para então isolar a molécula desejada e purificá-la até a homogeneidade. Um polissacarídeo é considerado puro se após ser isolado por dois procedimentos diferentes, as preparações resultantes possuírem as mesmas propriedades químicas, físicas e biológicas (PAZUR, 1994).



O comportamento dos polissacarídeos na filtração em gel oferece informações acerca da pureza da preparação polissacarídica e a simetria no pico de eluição demonstra se as moléculas são homogêneas (BOYER, 1993; CORRADI DA SILVA et al., 2005)

A estrutura primária de um EPS é definida pela sua composição monossacarídica, a seqüência do tipo de anel dos monossacarídeos constituintes, tipo de ligação glicosídica, entre outras características (PAZUR, 1994).

Nenhuma técnica sozinha é capaz de determinar todos esses parâmetros, sendo necessária uma combinação de metodologias. Todas as estratégias para determinação estrutural incluem uma despolimerização total ou parcial por hidrólise ácida com diferentes tipos de ácidos, temperaturas e tempos. Estes tratamentos produzem mono ou oligossacarídeos que são posteriormente analisados por cromatografia. Na cromatografia líquida de alta pressão em troca aniônica (HPAEC) a coluna cromatográfica tem uma matriz polimérica básica caracterizada por alta estabilidade química e seletividade, determinada pela fase móvel. A separação é realizada em um pH altamente alcalino e a detecção é alcançada por monitoramento da mudança de carga elétrica devido a oxidação dos açúcares na superfície de eletrodos localizados em um detector de amperometria pulsada. Este procedimento é muito sensível e seletivo para a análise de comportamento de açúcares em seu estágio nativo (RUAS-MADIEDO, HUGENHOLTZ, ZOON, 2002).

A utilização do HPAEC/PAD é uma ferramenta valiosa para a análise e separação dos carboidratos, não derivatizados, em níveis de nanomoles (nmol). As colunas empregadas devem ser específicas para a separação e análise de mono-, oligo- e polissacarídeos de baixa massa molecular. Portanto, a primeira medida a ser tomada a respeito da análise estrutural de um polissacarídeo é conhecer seus resíduos monossacarídeos (NELSON, COX, 2000; CORRADI DA SILVA et al., 2006) e a análise do hidrolisado depende do equipamento disponível no laboratório (BARBOSA et al., 2003).

A metilação é uma técnica utilizada com o objetivo de estabelecer a posição da ligação glicosídica e o tipo de anel dos açúcares constituintes. A técnica

envolve a permetilação de todas as hidroxilas livres dos açúcares, seguida da liberação de monossacarídeos metilados por hidrólise ou metanólise. A redução seguida da acetilação permite que esses derivados metilados sejam analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Padrões de fragmentação característicos de açúcares individuais são obtidos pela combinação de c.f.g. – e.m. (cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massa) (MONTREUIL et al., 1994).

Embora a metilação seja considerada um dos principais métodos para estudar a estrutura dos carboidratos, não é capaz de proporcionar informação adequada a respeito da configuração anomérica e do arranjo espacial das várias unidades monossacarídicas. Por isso, é utilizada a ressonância magnética nuclear na determinação da estrutura. Esta técnica baseia-se na observação de que núcleos magnéticos tais como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  e  $^{15}\text{N}$  podem absorver energia em frequências características, quando colocados em um campo magnético forte. A frequência de ressonância de um núcleo particular, expressa como deslocamento químico ( $\delta$ ), é sensível ao ambiente químico da molécula, tornando a RMN uma técnica valiosíssima para estudos estruturais (GORIN, 1980; MONTREUIL et al., 1994). Cada molécula tem um espectro de RMN característico que pode ser usado como uma impressão digital (*fingerprint*) da mesma. Outra grande vantagem desta técnica é o seu caráter não destrutivo, tornando-a uma das primeiras técnicas escolhidas para a caracterização estrutural (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

A espectroscopia no infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR) é uma técnica utilizada para detectar variações nos estados de energia vibracional das moléculas (KACURÁCOVÁ et al., 2002; WOLKERS et al., 2004). As frequências vibracionais são específicas para cada grupo funcional, sensíveis ao ambiente molecular, conformação e características das cadeias, tornando a espectroscopia um bom método para análises de biopolímeros (CAMPBELL, WHITE, 1989).

Embora o espectro no infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura molecular. A presença dessas bandas características de grupos permite a obtenção, através de

simples exame do espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis, e é neste fato que se baseia a identificação de estruturas (ŠANDULA et al., 1999).

O FT-IR é uma técnica utilizada com sucesso para polissacarídeos (BARBOSA, et al., 2003; CORRADI DA SILVA et al., 2006) sendo usualmente restrito à identificação de características estruturais específicas, como a configuração das ligações glicosídicas, a presença de ácido urônico, através do sinal característico da carboxila e até mesmo a presença de proteína (GRAY et al., 2000).

Grau de ramificação, massa molecular e conformação dos polissacarídeos são alguns dos fatores físico-químicos que podem influenciar no efeito dessas moléculas sobre o organismo (YOUNG, JACOBS, 1998; LEUNG et al., 2006). Tripla hélice, hélice simples e randômica são os tipos de conformações apresentadas pelos polissacarídeos quando em soluções aquosas e de acordo com Mueller e colaboradores (2000) as conformações em hélice podem ser reconhecidas por receptores celulares. Vários estudos sugerem que a tripla hélice é a conformação mais bioativa (YOUNG, JACOBS, 1998).

Algumas metodologias podem ser adotadas para estudar o tipo de conformação, baseando-se principalmente na interação entre o EPS e o corante Vermelho Congo, na presença de concentrações crescentes de NaOH (0,05 M a 0,5 M) (OGAWA, et al., 1972). Esta análise pode determinar a presença ou não da tripla hélice, importante para as aplicações biológicas. A figura 1 mostra esquematicamente como estas conformações podem estar distribuídas pelas moléculas.

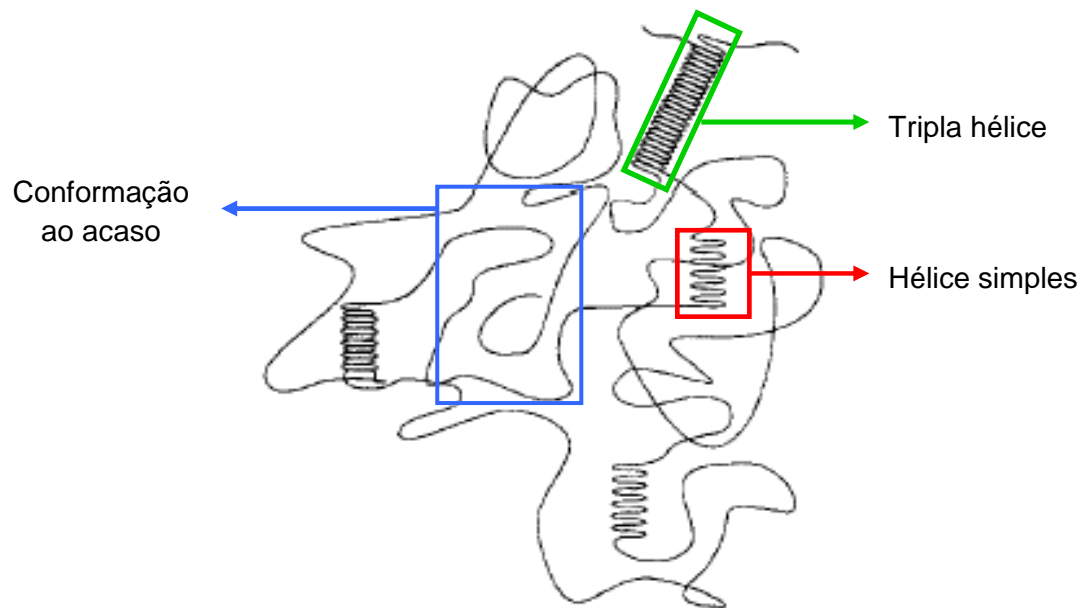


Figura 1 – Tipos de conformação adotados por cadeias de polissacarídeos (Fonte: KULICKE, LETTAU, THIELKING, 1997 apud MENDES, 2008).

A pesquisa de exopolissacarídeos microbianos envolve uma série de estágios, incluindo seleção de cepas, produção (processo fermentativo), otimização do processo, determinação estrutural e análise de conformação, estudos das propriedades físico-químicas, biológicas e aplicações industriais. A busca por tecnologias limpas tem levado ao interesse cada vez maior na utilização dessas moléculas como fontes renováveis. Estes polímeros, com estruturas complexas e diferentes propriedades, podem ser substitutos eficientes para aqueles derivados de plantas ou algas (KUMAR, MODY, 2009).

### 3.3. Glucanas Fúngicas

Com base em resultados provenientes da caracterização química dos polissacarídeos alguns autores propõem a utilização dessas macromoléculas microbianas estruturais como marcadores para a classificação taxonômica de fungos filamentosos, leveduras e líquens (GORIN; SPENCER, 1970; TEIXEIRA, IACOMINI; GORIN, 1995; CARBONERO et al., 2003; CARBONERO et al., 2005; PESSONI et al., 2005).

Nos fungos os polissacarídeos constituem um percentual importante da biomassa, sendo responsável por cerca de 75% da parede da hifa, principalmente em basidiomicetos. Além de atuarem como um suporte para a hifa, esses polímeros também podem constituir uma “capa” extracelular ao redor do micélio (GUTIÉRREZ; PRIETO; MARTINEZ, 1996).

A maioria dos polissacarídeos de fungos são homopolissacarídeos, ou seja, compostos por um único tipo de monômero, normalmente glucose, reunidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  ou  $\beta$ . No caso das glucanas, por exemplo, as ligações entre suas unidades de glucose podem ser do tipo  $\alpha$ -(1→3),  $\alpha$ -(1→6),  $\alpha$ -(1→4);  $\beta$ -(1→3) ou  $\beta$ -(1→6), podendo conter ramificações ao longo da cadeia principal (MOHACEK-GROSEV, BOZAC, PUPPELS, 2001).

Estes polímeros são estruturas altamente ordenadas, diferenciando-se pelo tipo de ligação glicosídica e massa molecular, características estas que conferem ações biológicas e reológicas distintas a essa classe de biomoléculas (CALAZANS et al., 2000; CORRADI DA SILVA et al., 2006; MORADALI et al., 2007).

Nos fungos, as glucanas podem contribuir para manter o pH ótimo para enzimas, além de impedirem a desidratação das hifas e de regularem a concentração de glucose extracelular. Essas moléculas ficam parcialmente dissolvidas no meio de cultivo quando o fungo cresce em meio líquido (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

Predominantemente, as glucanas fúngicas são componentes estruturais, servindo de arcabouço para outros polissacarídeos na formação da parede celular de leveduras e fungos.

Poucos fungos descritos são capazes de produzir  $\alpha$ -glucanas (CORRADI DA SILVA et al., 2006), porém entre esses tipos de exopolissacarídeos destaca-se a pululana, produzida pelo *Aureobasidium pullulans* e, atualmente, considerada como um produto industrial emergente.

O pululana é uma glucana solúvel constituída por unidades de maltotriose,  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), alternadas por resíduos glucopiranosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) ligados, com conformação randômica e que serve de modelo de estudo do comportamento de polissacarídeos solúveis em soluções aquosas (SINGH et al., 2008). Dependendo da proporção dessas ligações na cadeia do polímero as propriedades físicas da molécula variam, tais como: flexibilidade da estrutura, aumento da solubilidade em água e capacidade de formação de filme e fibra (BONGIOVANI, 2008).

O fungo *Tremella mesenterica* também é produtor de uma  $\alpha$ -glucana, com ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 6) na proporção de 2:1 e estruturalmente muito semelhante à pululana. Alguns autores acreditam que a proporção de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 6) possa variar em função da linhagem fúngica estudada, embora tais variações nem sempre ocorram após purificação (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

Os principais tipos de polissacarídeos fúngicos são as  $\beta$ -glucanas encontradas mais especificamente na parede celular de leveduras e fungos filamentosos, como constituinte minoritário do citossol fúngico e como polímero secretado para o ambiente (WILLIAMS, 1997). *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium glucanicum*, *Monilinia fructigena*, *Botrytis cinerea* são alguns dos fungos filamentosos mais investigados e que secretam  $\beta$ -glucanas com estrutura molecular semelhantes e uniformes, mas que diferem substancialmente em suas massas moleculares (RAU, 2004)

As glucanas mais estudadas são aquelas com ligação  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3). Efetivamente, estes polímeros exibem interessantes propriedades físico-químicas, especialmente a capacidade de formação de géis, o que faz com que sejam estudados para aplicações em alimentos. Entretanto, também apresentam atividades associadas com aplicações médicas, farmacêuticas e cosméticas. São

divididas em classes, dependendo de suas características estruturais (LAROCHE, MICHAUD, 2007).

Algumas homoglicanas são formadas por uma cadeia principal de unidades glucopiranosídicas  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) ligadas com substituições em C-6 por unidades simples  $\beta$ -D-glucopiranosídicas. A esquizofilana (produzida pelo *Schizophyllum commune*) e a escleroglicana (sintetizada pelo *Sclerotium glaucanicum*) podem apresentar algumas diferenças na formação de microgéis, mesmo apresentando a mesma estrutura química. A escleroglicana tem maior tendência para formar microgéis, o que pode dificultar sua filtração e comportamento de adsorção quando utilizada como aditivo na recuperação de áreas com derramamento de óleo. Neste caso, é mais interessante a aplicação da esquizofilana, que não apresenta esse comportamento (RAU, 2004)

As glucanas que apresentam ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6) são as mais descritas em artigos e patentes e apresentam estruturas lineares, ramificadas ou cíclicas (LAROCHE, MICHAUD, 2007); são alvo das pesquisas por seus efeitos imunológicos e farmacológicos (VETVICKA et al., 2008).

O principal componente encontrado no extrato aquoso do corpo de frutificação de *Boletus erythropus* foi uma glucana contendo resíduos glucopiranosídicos  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) ligados com substituição em O-6 por terminais não redutores de  $\beta$ -D-Glcp, na frequência de 1:3 (CHAVEUAU et al., 1996). O fungo *Pestalotia* sp. 815 quando cultivado em meio contendo glucose, produz um exopolissacarídeo constituído por unidades glucosídicas, denominado de pestalotana. Estudos químicos e enzimáticos indicaram que esta exoglicana tem uma estrutura muito ramificada, contendo uma cadeia principal constituída de resíduos glucopiranosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) ligados e substituídos em C-6 por resíduos glucosídicos em três de cada cinco unidades da cadeia principal e, em menor proporção, por resíduos gentiobiosídicos (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

Vários isolados do gênero *Pleurotus* foram investigados em relação à produção de exopolissacarídeos. Os estudos demonstraram as presenças de homopolímeros e heteropolímeros, sendo o principal componente uma  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) glucana com ramificações em C-6 por unidades  $\beta$ -D-glucopiranosídicas

(GUTIERREZ, PRIETO, MARTÍNEZ, 1996). Fungos deste grupo de basidiomicetos são bastante utilizados na culinária asiática e estudos recentes mostram que as glucanas, apresentam atividade antimutagênica quando sulfatadas (MANTOVANI et al., 2008).

Amaral e colaboradores (2008) caracterizaram através de análises de metilação, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e degradação controlada de Smith, uma glucana solúvel em água, obtida do *Ganoderma resinaceum*, como tendo uma cadeia principal de unidades glucopiranosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) ligadas e altamente substituídas em C-6 por cadeias laterais de resíduos glucopiranosídicos O-4 ligados. Glucanas com esse tipo de estrutura ainda não haviam sido descritas em basidiomicetos.

As glucanas  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6) têm mostrado possuir diferentes conformações em solução: randômica (ao acaso), hélice simples ou tripla-hélice (FARIÑA et al., 2001), estando este último tipo relacionado com a atividade biológica dessas moléculas (DU et al., 2004; CORRADI DA SILVA et al., 2005), além da frequência e complexidade das ramificações bem como a massa molecular (DU et al., 2004; DONG, JIA, FANG, 2006).

Tem sido descrito que glucanas  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) com conformação helicoidal tripla formam complexos com o corante Congo Red em soluções alcalinas diluídas. A formação do complexo vermelho congo-glucana pode ser acompanhada por mudanças no comprimento de onda de máximo absorção do Vermelho Congo (DONG, JIA, FANG, 2006).

Segundo Zhang e colaboradores (2002) muitas glucanas  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6) adotam conformações helicoidais ordenadas em solução aquosa e, em um ambiente alcalino, podem ter estas estruturas desnaturadas devido à quebra das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, levando à redução da viscosidade das soluções desses polímeros.

Dong, Jia e Fang (2006) estudaram uma  $\beta$ -glucana, pouco solúvel em água, denominada HEP 3, isolada do fungo comestível *Hericiium erinaceus*. As análises de metilação, FT-IR e ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , mostraram



que a estrutura era composta por uma cadeia principal de resíduos glucopiranosídicos unidos por ligação  $\beta$ -D(1 $\rightarrow$ 3), com ramificações de unidades glucosídicas em O-6, a cada três resíduos da cadeia principal. A solução do polímero com conformação em tripla hélice era desorganizada na presença de um ambiente alcalino, acompanhada pela mudança na viscosidade intrínseca da solução, como consequência da quebra gradual das ligações de hidrogênio na presença de NaOH.

$\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) glucanas podem ser encontradas na parede celular de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (KLIS et al., 2002) entretanto, a presença desse tipo de polímero como produto de excreção é bastante raro. Sasaki e colaboradores (2002) relataram que o fitopatógeno *Guignardia citricarpa* secreta um polissacarídeo identificado como  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) glucana, semelhante a pustulana isolado do líquen *Umbilicaria pustulata*.

Apesar da necessidade de extração dos polissacarídeos da parede celular ou corpo de frutificação da maior parte dos microrganismos, várias glucanas podem ser lançadas diretamente no meio de cultivo. Essa característica da produção facilita a aplicação em escala industrial e torna o processo menos dispendioso.

### **3.4. Importância biotecnológica dos exopolissacarídeos**

Recentemente, os polissacarídeos microbianos, têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de uso em uma ampla variedade de áreas industriais (METHACANON et al., 2005), podendo ser aplicados como emulsificantes, estabilizantes, geleificantes, lubrificantes ou biofilmes (SUTHERLAND, 1998; SHAH et al., 2000; GORRET et al., 2003). Dentre eles, destacam-se os exopolissacarídeos.

Alguns tipos de exopolissacarídeos já são aceitos e produzidos por biotecnologia, enquanto outros ainda estão em fase de estudo. O uso de cada polímero varia bastante, mas existe um grande interesse nesses compostos como potenciais substitutos das gomas derivadas de plantas (SUTHERLAND, 1998),

principalmente pela produção dos EPS microbianos ocorrer independente de variações climáticas, pelos EPS serem recuperados e purificados mais facilmente e também pela possibilidade de utilização de processos fermentativos que levem à obtenção de altas concentrações do produto puro (SELBMANN, CROGNALE, PETRUCCIOLI, 2002). Além disso, podem ser produzidos durante o ano todo e não necessitam de ambientes geográficos específicos, como ocorre com as plantas (KHAN et al., 2007).

De acordo com Saude, Junter (2002), a produção de exopolissacarídeos em escala industrial pode se tornar mais viável economicamente desde que sejam elucidadas suas características químicas e físicas, determinando sua estrutura e seu comportamento reológico dentro de grandes biorreatores.

Várias bactérias vêm sendo exploradas para a produção comercial desses polímeros para fins de aplicação em produtos alimentícios, cosméticos e medicamentos, principalmente devido ao seu alto grau de viscosidade e incluem xantana, dextrana e gelana (SUTHERLAND, 2001; BARBOSA et al., 2003). Inicialmente, houve um desenvolvimento mais acentuado sobre a produção de EPS produzidos por bactérias e posteriormente, por fungos (BARBOSA et al., 2004).

O exopolissacarídeo mais importante, obtido por fermentação, foi a dextrana, descrito por Scheibler em 1874. Possui a fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , é produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, isolada e nominada pela primeira vez por Van Tieghen em 1880. Somente em meados do século XX, Grönwall e outros pesquisadores descreveram o uso e processos de fabricação de dextrana. Portanto, foi a partir da dextrana que se iniciou e se desenvolveu o estudo dos exopolissacarídeos microbianos (BARBOSA et al., 2004).

A experiência de aplicação de exopolissacarídeos neutros como polímeros bioativos começou a partir de 1944, com a utilização da dextrana como substituinte de plasma sanguíneo. Estas preparações são destinadas a manter o volume de sangue circulante bem como a pressão osmótica em casos de perda maciça de sangue (SHINGEL, 2004).

Na verdade, o termo dextrana coletivamente pode ser referido a uma grande classe de glucanas extracelulares produzidas não somente por *Leuconostoc*,

mas também pelos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, consistindo de cadeias lineares glucopiranosídicas  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 com ramificações do tipo  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 2,  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3 ou  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4, resultando em uma estrutura altamente ramificada (KHAN et al., 2007). As dextranas apresentam grande potencial para aplicação em vários produtos alimentares, servindo como estabilizantes e inibidores de cristalização em sorvetes ou como agentes geleificantes em gomas e geléias (KHAN et al., 2007).

A xantana, produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*, é o exopolímero mais produzido comercialmente, sendo extensivamente estudado e utilizado em diferentes tipos de aplicações industriais, devido ao seu alto grau de viscosidade (MORRIS et al., 2001; SILVA et al., 2009). Esta goma é um heteropolímero constituído por unidades  $\beta$ -D-glucopiranosídicas 4-O substituídas, com unidades pentassacarídicas repetitivas ao longo da cadeia principal; formadas por unidades de glucose alternadas com substituição em O-3 por uma ramificação trissacarídica: manose: ácido glucurônico: manose (GARCIA-UCHOA et al., 2000; BONGIOVANI, 2008).

Outro biopolímero denominado de goma idutana foi isolado de bactérias do gênero *Sphingomonas*, apresentando características de viscosidade semelhantes a xantana, despertando interesse em sua aplicação na recuperação terciária do petróleo (NAVARRETE, SHAH, 2001).

Os microrganismos lácticos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* são utilizados em conjunto, como culturas iniciais na produção de iogurte, sendo que a textura cremosa deste composto parece estar ligada com a produção de exopolissacarídeo pelo *S. thermophilus* (NAVARINI, 2001).

Algumas espécies de cianobactérias têm demonstrado capacidade para produzir grande quantidade de exopolissacarídeos (SHAH et al., 2000). De acordo com Richert e colaboradores (2005) estudos têm sido realizados com EPS cianobacterianos, como os produzidos por *Cyanospira capsulata* e *Aphanotehce halophyta*, e que apresentam comportamento viscoso semelhante à xantana. Segundo ainda os mesmos autores, EPS produzidos por *Anabaena* sp e que

possuem capacidade de se ligar a íons metálicos, podem ser aplicados com sucesso no tratamentos de águas residuais de indústrias.

Outros tipos de bactérias, pertencentes aos gêneros *Agrobacterium* e *Rhizobium*, podem sintetizar diferentes EPS sob condições fisiológicas apropriadas, como a curdulana, de peso molecular relativamente baixo (VILLAIN-SIMONNET, MILAS, RINAUDO, 2000).

A curdulana é uma  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) glucana linear neutra, produzida e excretada como um metabólito secundário principalmente por *Agrobacterium*. Apresenta-se insolúvel em água, alcoóis e maioria dos solventes orgânicos, mas é solúvel em NaOH, DMSO (dimetilsulfóxido) e ácido fórmico. Apresenta capacidade para formar diferentes tipos de géis dependendo da temperatura: em até 55 °C forma géis mais fracos, enquanto que temperaturas em torno de 80-100 °C aumentam a força dos géis, tornando-os firmes e resistentes. A temperatura de autoclavação (120 °C) leva a formação de estrutura em tripla hélice (LAROCHE, MICHAUD, 2007).

Esse polímero apresenta propriedades físico-químicas interessantes do ponto de vista industrial, tendo potencial para ser utilizado como aditivo alimentar em pequenas quantidades, contribuindo para a melhoria da estabilidade e da qualidade de inúmeros produtos alimentícios. Apresenta também, considerável potencial de uso na área médica, na produção de medicamentos contra infecções e como agente anticoagulante e antitrombótico (CUNHA et al., 2004).

Outro exemplo interessante de exopolissacarídeo é a gelana, produzida pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis* (*Pseudomonas elodea*) sob condições de cultivo submerso e aeróbico. Esse polímero é composto por sequências repetidas tetrassacarídicas de glucose, raminose e ácido glucurônico, dispostas como  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucose,  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-D-glucuronato,  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucose e  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)-L-raminose. O polissacarídeo forma um gel elástico devido a presença de grupos O-acetil e O-gliceril, enquanto que a deacetilação origina géis mais firmes (KUMAR, MODY, 2009).

A gelana pode ser aplicada como um substituto do ágar em cultivos para microrganismos, principalmente termófilos ou em cultura de tecidos vegetais,

sendo necessária metade da quantidade de gelatina, em comparação ao ágar, para formação de gel firme. As propriedades físico-químicas encontradas na gelatina proporcionam sua utilização pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e outras, pois pode ser usada, além de gelificante, como texturizante, estabilizante, espessante e emulsificante. Também apresenta sinergismo com outros polímeros, como a gelatina e a goma arábica (KUMAR, MODY, 2009).

Os EPS fúngicos, como escleroglucana, epiglucana, lentinana e esquizofilana, são estudados principalmente em relação às funções biológicas e farmacológicas que apresentam. Muitas propriedades médicas e terapêuticas são atribuídas aos polissacarídeos presentes em fungos basidiomicetos, mas os ascomicetos também vêm sendo estudados neste sentido (BARBOSA et al., 2003; STELUTI et al., 2004; CORRADI DA SILVA et al., 2005; MIRANDA et al., 2008).

Dentre os EPS produzidos por fungos, os que apresentam destaque do ponto de vista comercial e industrial são a escleroglucana e a pululana.

A pululana é uma  $\alpha$ -glucana produzida pelo *Aerobasidium pullulans*, mas que foi também caracterizada em outros microrganismos, como cepas de *Cryphonectria parasítica*, um fungo fitopatogênico de castanheira (DELBEN et al., 2006).

De acordo com Sutherland (1998) a pululana é resistente ao óleo e pode ser aplicado em poços de petróleo. Forma filmes solúveis em água com baixa permeabilidade ao oxigênio, e pode por isso revestir alimentos, retendo o sabor e aparência. Soluções deste EPS podem também ser usadas para formar coberturas, sem odor e sabor, sobre alimentos. Este polímero é também um bom adesivo e pode ser usado na preparação de fibras, como um componente de sistemas aquosos bifásicos. Pode ser usado para preparar padrões de massa molecular de baixa dispersão para calibrar HPLC. Uma nova particularidade do uso de pululana é como pré-biótico para promover seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium spp* no intestino humano, seguindo sua incorporação sobre alimentos de dieta especializada.

A escleroglucana é um exopolissacarídeo neutro, naturalmente solúvel em água e produzido por fermentação pelos fungos *Sclerotium rofsii* e

*Sclerotinia sclerotium*. Apesar de exibirem alta viscosidade em soluções aquosas, não apresentam peso molecular muito alto, entretanto, apresentam estrutura molecular em tripla hélice. Diferente da maioria das gomas naturais e sintéticas, esta glucana mantém suas propriedades físicas, incluindo a viscosidade, na presença de sais, em altas temperaturas ou pH extremos (2,5 a 12), o que pode favorecer sua utilização na indústria. Polissacarídeos similares a escleroglucana também podem ser produzidos por leveduras (KUMAR, MODY, 2009).

### **3.4.1 Aplicações biológicas de glucanas fúngicas**

Os avanços científicos em relação à produção e utilização de substâncias bioativas produzidas por microrganismos visam sempre a melhora da qualidade de vida humana. Por exemplo em doenças neoplásicas onde as defesas do organismo normalmente estão diminuídas, podem ser aplicados polissacarídeos microbianos com atividade imunomoduladora, melhorando a função das células do sistema imunológico, que têm importante papel na eliminação local de tumores e das células próximas aos tumores, resultando na inibição do crescimento e de metástase (HAN et al., 1999, MANTOVANI et al., 2008; ZHANG et al., 2004). Esses biopolímeros podem ser administrados durante o tratamento quimioterápico ou antes, como ação preventiva contra os efeitos colaterais que as drogas podem causar, durante o tratamento.

Com o intuito de desenvolver novas substâncias antitumorais com baixa ou nenhuma toxicidade, glucanas fúngicas tem sido testadas, visando a obtenção de novos imunoterápicos que não apresentem efeitos colaterais (HAN et al., 1999). As glucanas são estudadas como componentes de um grupo de drogas conhecidas como modificadores de resposta biológica (BRM), que influenciam a resposta do hospedeiro por estimulação do sistema imune (BOHN e BeMILLER, 1995) e que entre outras funções, incluem efeitos antitumorais e prevenção de efeitos carcinogênicos (WASSER; WEIS, 1999; LEUNG et al., 2006; LAROCHE, MICHAUD, 2007).

As  $\beta$ -D-glucanas são reconhecidas pelo sistema imunológico inato de vertebrados através de receptores de superfície celular, designados primariamente para o controle de patógenos fúngicos (BORCHERS, 2004). Elas reconhecem e se ligam aos receptores de diversas células humanas, como macrófagos, monócitos, neutrófilos e células NK (Natural Killer) e, também, de células não imunológicas como as endoteliais e os fibroblastos (BROWN; GORDON, 2003). A estimulação do sistema imune pelas  $\beta$ -glucanas pode também promover nos organismos efeitos contra vírus, bactérias, fungos e parasitas, devido a ativação principalmente dos macrófagos (SHIN et al., 2007; ZHANG et al., 2003).

Trabalhos realizados com os basidiomicetos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*, alguns dos vários fungos utilizados na medicina popular japonesa e chinesa na prevenção e tratamento de doenças como diferentes tipos de tumores malignos, mostraram que o potencial desses fungos está ligado com a produção dos polissacarídeos. (LIMA et al., 2001; DELMANTO et al., 2001; CHEN et al., 2004). Outro fungo deste grupo que também é utilizado nesse sentido é o *Ganoderma lucidum*, que possui tanto exopolissacarídeos, quanto endopolissacarídeos (corpo de frutificação) com aplicação antitumoral (BABITSKAYA et al., 2005).

Além de atividades imunoprotetoras, exopolissacarídeos do tipo  $\beta$ -glucanas, produzidos por diversas espécies de fungos, têm sido examinados em relação as ações antioxidante, antiviral, antiinflamatória, anticoagulante e antitrombótica (ZHANG et al., 2005; CORRADI DA SILVA et al., 2006). Essas glucanas podem apresentar algumas dessas ações quando modificadas por sulfatação.

Glucanas de fungos parecem inibir estágios iniciais de infecção de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) por vírus de diferentes grupos taxonômicos. Várias glucanas foram isoladas da parede celular de *Phytophthora parasítica*, *Phytophthora megasperma* e de *Fusarium oxysporum* e tiveram sua atividade antiviral comparada quando as folhas de tabaco foram inoculadas com o vírus do mosaico do tabaco. Essas glucanas eram do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3,  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6). A alta atividade apresentada está relacionada com um alto grau de ramificação em C-6 e com o tamanho e a natureza glicosídica das cadeias laterais. A massa molecular e a organização da estrutura não são essenciais para a atividade antiviral. Essas glucanas, portanto,

são consideradas como inibidores de infecção. Substâncias antivirais são em grande parte obtidas de microrganismos. (ROUHIER et al., 1995)

A liquenana, uma  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glucana linear do líquen *Cetraria islandica* exibe atividade antiviral contra vírus de várias espécies do gênero *Nicotiana*. As glucanas foram efetivas quando adicionadas diretamente ao inóculo viral ou aplicada várias vezes antes ou rapidamente depois da inoculação com o vírus, mostrando que os estágios iniciais da infecção foram inibidos e que as glucanas não agem diretamente sobre os vírus, mas tornam o hospedeiro mais resistente à infecção (ROUHIER et al., 1995)

$\beta$ - D (1 $\rightarrow$ 3)-glucanas de fungos são capazes de causar efeitos benéficos nas respostas pré-inflamatórias, indicando que podem regular a ação de mediadores da resposta inflamatória, como as interleucinas (MANTOVANI et al., 2008).

De acordo com Rocha e colaboradores (2007) o oxigênio tem um significado fundamental para os organismos aeróbicos, pois participa de vários processos como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória, na biossíntese de moléculas como as prostaglandinas e na oxidação de substâncias aromáticas, entre outros. Os radicais livres e outros derivados ativos do oxigênio são co-produzidos nessas reações biológicas e exercem papel fisiológico importante, mas também estão envolvidos em vários processos deletérios ao organismo humano como o câncer, a aterosclerose ou a artrite reumatóide.

Normalmente, os organismos aeróbicos possuem mecanismos naturais fisiológicos e bioquímicos de defesa contra os efeitos das espécies reativas do oxigênio, através da produção de substâncias antioxidantes. Entretanto, algumas vezes esses mecanismos naturais não são eficazes devido a grande quantidade de radicais livres produzidos, portanto outras substâncias podem ser utilizadas para auxiliar na neutralização maléfica desses compostos nas células (ROCHA et al., 2007).

Os principais estudos de atividade antioxidante são centrados em polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, mas algumas glucanas quimicamente sulfatadas também estão sendo testadas com este fim (MANTOVANI et al., 2008).



Alguns estudos mostram que os radicais livres podem estar envolvidos nos processos de neurodegeneração em doenças como Parkinson e Alzheimer e por isso diferentes moléculas podem ser testadas para minimizar a presença dessas substâncias. Um exopolissacarídeo denominado EPS 2 produzido pelo fungo marinho filamentoso *Keissleriella*, apresentou efeitos protetores contra a toxicidade celular induzida pelo peróxido de hidrogênio em culturas de células, linhagem PC12, de rato (SUN et al., 2005).

A heparina é um polissacarídeo naturalmente sulfatado produzida pelo organismo humano e animais, mas que para uso comercial é obtida a partir de intestino de porco ou pulmão de boi, onde ocorre em baixas concentrações. Esta molécula é constituída por unidades repetidas de dissacarídeos de glucosamina e ácido sulfoidurônico com seqüências menores contendo vários níveis de grupos sulfo e ácido glucurônico (ligações 1-4 com resíduos de grupo sulfato em 2 e 6) (TOIDA, CHAIDEDGUMJORN, LINHARDT, 2003). Sua atividade anticoagulante e, possivelmente, antitrombótica é mediada por co-fatores específicos do plasma como antitrombina e co-factor II da heparina. Uma seqüência pentassacarídica específica presente na estrutura da heparina é necessária para sua atividade. Esta seqüência apresenta um padrão específico de sulfatação e composição monossacarídica, que induz a ativação conformacional da antitrombina. A heparina exhibe ainda um mecanismo anticoagulante adicional que é resultante de uma ponte entre a protease e a antitrombina. (MELO et al., 2008).

Entretanto, apesar do seu amplo uso a heparina apresenta alguns efeitos adversos, como complicações de sangramento por uso prolongado e, além disso, por ser obtida de animais, o risco de contaminação por microrganismos específicos de animais é maior (MELO et al., 2004; WANG et al., 2007). Por isso, as limitações apresentadas por esse medicamento estimulam a procura por drogas mais seguras, vindos de outras fontes naturais o que explica os esforços para desenvolver agentes anticoagulantes e antitrombóticos mais específicos e potentes (BEGUIN, LINDHOUT, HEMKER, 1988; MARSH, APPADU, 2007).

Polissacarídeos de origem microbiana naturalmente sulfatados ou derivatizados por sulfatação, podem não apresentar os efeitos colaterais da heparina e atuarem como anticoagulantes eficazes. Polissacarídeos de algas, naturalmente

sulfatados, têm sido estudados para este fim. Recentemente,  $\beta$ -glucanas tem sido quimicamente sulfatadas para serem aplicadas como agentes anticoagulantes (ATHUKORALA et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que entre os polissacarídeos modificados por sulfatação química com ação anticoagulante e/ ou antitrombótica destacam-se as glucanas sulfatadas, as galactoglucomananas, as galactomananas e dextranas sulfatadas. Martinichen-Herrero e colaboradores (2005 A) estudando uma  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucana, quimicamente sulfatada, observaram que o efeito anticoagulante deste polímero era dose-dependente em todos os testes de coagulação empregados no estudo e, além disso, a glucana sulfatada foi capaz de inibir a trombina diretamente.

A botriosferana,  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6) glucana, é um exopolissacarídeo produzido pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 quando cultivado em diferentes fontes de carbono. Esse polímero apresenta atividade antimutagênica quando produzido em glucose (MIRANDA et al., 2008). Procedimentos de sulfatação no botriosferana (MENDES, 2008), obtido em cultivos com frutose, geraram uma molécula com atividade anticoagulante demonstrada pelos ensaios clássicos de coagulação APTT, TT e PT.

De acordo com VETVICKA et al., (2008), várias glucanas têm sido descritas na literatura e, segundo o autor, ainda que as diferenças apresentadas por esses polímeros sejam mínimas é importante que cada uma delas seja avaliada em relação às suas propriedades biológicas antes que possam ser aplicadas na prática clínica.

Entretanto, a elevada viscosidade apresentada pelas soluções de algumas glucanas tem limitado as suas aplicações, portanto, modificações químicas têm auxiliado na obtenção de polímeros cujas soluções são passíveis de ensaios de atividade biológica.

### **3.5. Sulfatação como procedimento de mudança química em glucanas fúngicas: vantagens para a atividade biológica**

Várias espécies de algas marinhas, animais (tanto invertebrados quanto vertebrados), plantas e líquens apresentam polissacarídeos naturalmente sulfatados como componentes de suas estruturas celulares (SHANMUGAN, MODY, 2000; MULLOY et al., 2000; MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005 A e B). Essas moléculas exibem diferentes funções nos tecidos de origem, como por exemplo, reconhecimento celular (MULLOY, 2005). Algumas propriedades biológicas têm sido atribuídas a esses polímeros, entre elas estão as atividades antiviral, anticoagulante e antitrombótica tornando-os alvo de extensas pesquisas (MARTINICHEN, 2001; TRENTO et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; HUANG, ZHANG, 2005; ZUÑIGA, MATSUHIRO, MEJÍAS, 2006). Entre os polissacarídeos naturalmente sulfatados estão as glicosaminoglicanas, carragenanas, fucanas, galactanas e galactomanas (MARTINICHEN, 2001).

Polissacarídeos microbianos neutros, quando quimicamente sulfatados podem exibir funções biológicas semelhantes às aquelas apresentadas pelos naturalmente sulfatados e, em alguns casos, até mesmo potencializar a ação biológica, visto que a bioatividade apresentada pelas macromoléculas, quando em solução, depende, entre outras características, da estrutura química da molécula.

Entre os processos para obtenção de novos polímeros estão aqueles de derivatização química como sulfonilação, fosforilação, carboximetilação e sulfatação. Essas reações têm sido utilizadas para melhorar a solubilidade assim como potencializar a atividade biológica de  $\beta$ -glucanas de elevada massa molecular, que são praticamente insolúveis em soluções aquosas neutras (BOHN, BeMILLER, 1995; RAMESH E THARANATHAN, 2003). Glucanas fúngicas pouco solúveis do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) com ação imunomoduladora quando administradas por via parental (intravenosa ou intraperitoneal), podem apresentar reações colaterais indesejáveis como formação de granulomas ou microembolização. A adição de grupos sulfatos pode aumentar a solubilidade dessas moléculas e permitir, também, seu uso oral, sem perda da atividade (SANDULA et al., 1999).

As primeiras reações de sulfatação descritas na literatura foram para os polímeros de celulose, dextrana, amido e quitosana (SOEDA et al, 2000, MÄHNER et al, 2001, MIHAI et al, 2001). Para o sucesso da derivatização alguns parâmetros, tais como reagente, temperatura e tempo de reação, devem ser estabelecidos para o polímero de interesse. Entre os solventes mais utilizados para a solubilização das moléculas estão formamida, dimetilformamida e dimetilsulfóxido. Considerando que os carboidratos são facilmente hidrolisados por ácido e que a reação de sulfatação ocorre em meio ácido, deve-se assegurar a completa isenção de água nos reagentes bem como a condução dos experimentos à baixa temperatura.

Entre os reagentes de sulfatação mais utilizados estão o ácido clorosulfônico em piridina –  $\text{HClSO}_3$ .Piridina (GERESH et al., 2002) e complexo de trióxido de enxofre em piridina –  $\text{SO}_3$  Piridina (WU et al., 1998). A piridina por ser uma base orgânica forte, pode atacar o polissacarídeo nucleofilicamente, enfraquecendo a ligação H-O e facilitando a entrada do agente sulfatante. Outra possível explicação seria que reação entre o complexo  $\text{SO}_3$  e o polissacarídeo provavelmente começa com a formação de uma ponte de hidrogênio com a hidroxila polissacarídica, o que aumenta a eletrofilicidade do enxofre e a nucleofilicidade do grupo OH. O ácido clorosulfônico pode reagir como um agente de sulfatação sozinho ou pode formar um complexo com bases orgânicas doadoras. A estabilidade do complexo formado depende da basicidade do composto orgânico usado e, por sua vez, a reatividade da reação de sulfatação é influenciada pela estabilidade do complexo. A piridina, como já dito anteriormente, possui uma alta basicidade o que conduz a formação de um sal Piridina.HCl estável (MIHAI et al., 2001). O grau de sulfatação, estabelecido com base no teor de enxofre, determina o percentual de polissacarídeo sulfatado (ALBAN, SCHAUERTE, FRANZ, 2002).

Estudos realizados com esquizofilana quimicamente sulfatada mostraram que ocorreu a estimulação de células do baço, um órgão do sistema imunológico, entretanto houve perda de atividade antitumoral em células de Sarcoma 180 (KOGAN, 2000).

Segundo Mihai e colaboradores (2001) o sulfato de dextrana atua como um análogo do anticoagulante heparina, uma glicosaminoglicana, sendo

menos ativo no retardo da coagulação, porém com ação sistêmica mais duradoura que a heparina; é também menos tóxico que outros polissacarídeos sulfatados. A síntese de outros polímeros sulfatados tais como curdulana, uma  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucana produziu uma molécula com efeito inibitório sob vírus, mas com baixa atividade anticoagulante (ZHANG et al., 2000). Entretanto, Alban e colaboradores (1995) por otimização da reação de sulfatação mostraram que a curdulana sulfatada também apresenta atividades anticoagulante e antitrombótica.

A sulfatação da pululana produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans* visou a obtenção de um derivado com ação anticoagulante, semelhante à apresentada pela heparina. Entretanto o mecanismo de ação do polímero sulfatado parece ser dependente da massa molecular, do grau de substituição e da distribuição e posição dos grupamentos sulfato nos resíduos de glucose (ALBAN, SCHAUERTE, FRANZ, 2002).

Portanto, a derivatização de glucanas por sulfatação oferece uma oportunidade para potencializar a atividade biológica ou mesmo desenvolver a atividade em moléculas não bioativas, para que possam ser utilizadas como novos agentes farmacológicos (LU et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008). Vale ressaltar que o entendimento básico dos parâmetros moleculares de um polissacarídeo sulfatado em solução aquosa é essencial para a interpretação do tipo de atividade biológica (HUANG, ZHANG, 2005).

### **3.6. Fungos do gênero *Botryosphaeria***

Os fungos do gênero *Botryosphaeria* são ascomicetos fitopatogênicos, com ampla distribuição mundial, causadores de doenças em plantas de importância econômica, danificando diversas madeiras comerciais, árvores frutíferas e ornamentais. Sua fitopatogenicidade é caracterizada por lesões necróticas no tronco e nos galhos, com intensa produção de gomose, levando à morte progressiva do ápice das árvores, denominado *dieback*. Por se tratar de um microrganismo com duplo estágio de propagação em seu ciclo de vida, fungos da família Botryosphaeriaceae podem ser encontrados tanto no estágio anamorfo

(sexuado), denominado *Lasiodiplodia theobromae* ou *Botryodiplodia theobromae*, quanto no estágio teleomorfo (assexuado), denominado *Botryosphaeria* (SALDANHA, 2006).

Os fungos do gênero *Botryosphaeria* têm sido estudados principalmente como patógenos de eucalipto (YUAN, MOHAMMED, 1997), acácia (ROUX, WINGFIELD, 1997) e de árvores frutíferas tais como pessegueiro, mangueira, macieira (LI et al., 1995; MASCARENHAS et al., 1995; RAMOS et al., 1997), podendo infectar várias partes da planta hospedeira como caule, folhas e frutos, em diferentes estágios do desenvolvimento.

O *Botryosphaeria ribis* é um dos fitopatógenos de *Eucalyptus citriodora* no Brasil (SILVEIRA et al., 1996) e também tem sido investigado como agente para o controle biológico da erva daninha americana melaleuca (*Melaleuca quinquenervia*), a qual é endêmica no sul da Flórida (RAYACHHETRY, ELLIOTT, 1997). O fungo *Botryosphaeria obtusa*, causador de doenças em maçãs, é produtor de fitotoxinas (VENKATASUBBAIAH et al., 1991).

A espécie *Botryodiplodia theobromae* é uma das mais estudadas quanto à patogenicidade, pois pode ser encontrada em várias partes do mundo, infectando diferentes tipos de plantas de importância econômica (ENCINAS, DANIEL, 1995; MASILAMANI, MUTHUMARY, 1996) Este fungo foi descrito como um patógeno facultativo que pode causar doenças tanto em plantas vivas, quanto em frutos e vegetais armazenados.

Um isolado de *Botryosphaeria* selecionado previamente como ligninolítico e identificado, recentemente, como *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, foi caracterizado como produtor constitutivo de lacases e posteriormente observou-se que o álcool veratrílico, um metabólito secundário produzido por alguns basidiomicetos ligninolíticos, exerce forte ação indutora na produção de lacases no referido isolado (BARBOSA et al., 1996). Vasconcelos e colaboradores (2000), otimizaram a produção de lacase pelo *B. rhodina*, utilizando o álcool veratrílico como indutor, através de planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta.

Dekker e Barbosa (2001) relataram pela primeira vez que o *B. rhodina* MAMB-05 também produz um exopolissacarídeo (EPS) responsável por

elevada viscosidade do meio de cultivo. Quando o microrganismo foi cultivado em glucose, como única fonte de carbono, o EPS produzido, denominado botriosferana, teve sua estrutura determinada como sendo uma  $\beta$ -D- (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) glucana, com cerca de 22% de ramificações no carbono 6 (BARBOSA et al., 2003).

Steluti e colaboradores (2004) analisaram a influência de diferentes fontes de carbono (glucose, frutose, galactose, manose, manitol, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melão de cana de açúcar) sobre a produção de botriosferana e concluíram que a sacarose comercial favorecia a formação do exopolissacarídeo.

Corradi da Silva e colaboradores (2005) caracterizaram os exopolissacarídeos produzidos em sacarose e frutose e verificaram que o grau de ramificação do EPS produzido pelo microrganismo crescido em sacarose foi de 21% enquanto o do EPS produzido em frutose foi de 31% (Figura 2). Observaram, ainda, que esta característica química conferia diferentes viscosidades às soluções desses exopolissacarídeos (BONGIOVANI, 2008).

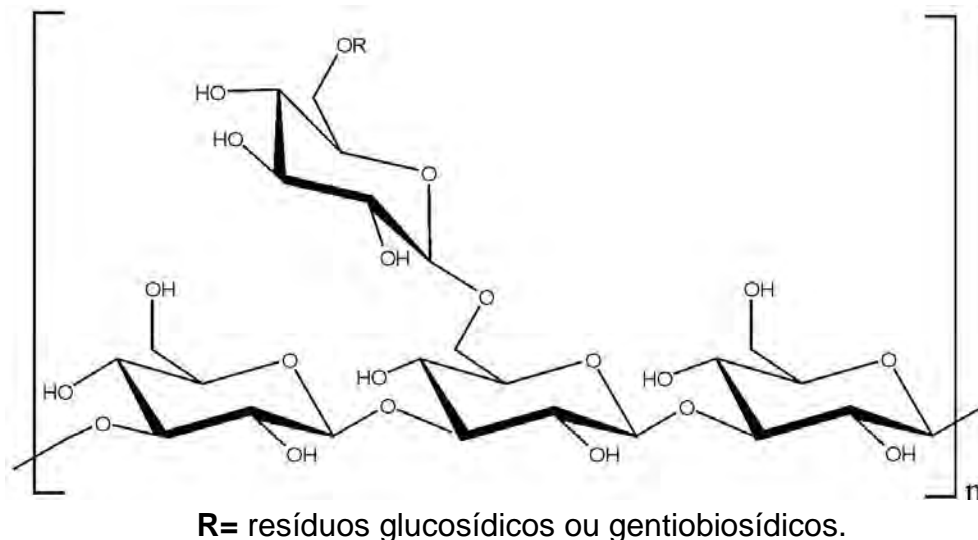


Figura 2 – Estrutura química do exopolissacarídeo produzido por *B. rhodina* MAMB-05 em frutose como fonte de carbono (fonte: BONGIOVANI, 2008).

Analisando a parede celular do *B. rhodina* MAMB-05, Corradi da Silva e colaboradores (2008), isolaram três D-glucanas que, após purificação por técnicas cromatográficas e caracterização química pelos métodos tradicionais da química de carboidratos, foram estruturalmente identificadas como:  $\beta$ -(1→6)-D-glucana,  $\beta$ -(1→3;1→6)-D-glucana e  $\alpha$ -(1→4;1→6)-D-glucana.

Os primeiros estudos sobre atividade biológica da botriosferana, obtida em glucose como fonte de carbono, mostraram que este EPS não é mutagênico e apresenta atividade anticlastogênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica (MIRANDA et al., 2008). Estudos realizados por Giese e colaboradores (2008) relataram que a botriosferana, obtido em glucose como fonte de carbono, apresenta conformação em tripla hélice, que tem sido descrita como necessária para a atividade biológica de polissacarídeos (FALCH et al., 2000; LEUNG et al., 2006).

Saldanha e colaboradores (2007) determinaram as relações genéticas entre nove isolados de *Botryosphaeria* ssp coletados de diferentes espécimes vegetais através de técnicas de biologia molecular. A análise das seqüências de nucleotídeos da região ITS mostrou oito isolados estreitamente relacionados, os quais foram classificados como *Botryosphaeria rhodina* e um isolado como *Botryosphaeria ribis*.

Neste trabalho, quatro dos isolados identificados como *Botryosphaeria rhodina* (Saldanha et al., 2007) obtidos de laranja, manga, graviola e pinha, foram utilizados para a produção dos exopolissacarídeos, que foram caracterizados e um deles selecionado e quimicamente modificação para os ensaios de atividade biológica. Nossa expectativa é que esse estudo seja o promotor da investigação do potencial biotecnológico desses isolados para a produção de polissacarídeos que possam atuar como substrato para a síntese de novas drogas terapêuticas.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes

Os principais reagentes químicos utilizados para o preparo dos meios de cultivo, das soluções, das técnicas de caracterização e de sulfatação foram de grau analítico, adquiridos da Merck, Fluka ou Sigma. Os testes de atividade anticoagulante foram realizados com kits Wiener (APTT e TT) e *In Vitro* Diagnóstica (PT).

### 4.2. Equipamentos

As pesagens foram realizadas em balanças analíticas Mettler Toledo AB204 e Micronal e semi-analíticas Gehaka BG-440 e Gehaka BG-2000.

A esterilização de meios de cultivo, soluções e vidrarias foram realizadas em autoclave vertical Fabbe, modelo 103, a 121 °C por 20 minutos.

A manipulação dos microrganismos e materiais estéreis foi realizada em câmara de fluxo laminar Veco, modelo VLFS-09.

Os cultivos microbianos foram desenvolvidos nas incubadoras Nova Ética 411D e orbital Cientec CT-712.

Para as concentrações das amostras foi utilizado evaporador rotativo Buchi, modelo R-114, com auxílio do banho-Maria Buchi, modelo B-480.

As centrifugações foram realizadas com a centrífuga Damon, modelo HT e com a micro centrífuga Beckman.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV/Vis-1601.

As hidrólises do polissacarídeo sulfatado foram realizadas em bloco de aquecimento modelo Digi Block, Laboratory Devices INC.

A cromatografia de exclusão molecular foi desenvolvida em coluna de vidro preenchida com gel de Sepharose CL-4B, com auxílio da bomba peristáltica Pump P-1, Amersham Pharmacia Biotech.

As frações obtidas da coluna cromatográfica foram coletadas com o coletor Frac-100, Amersham Pharmacia Biotech.

As liofilizações dos materiais em estudo foram realizadas em liofilizador modelo E.C, da Edwards.

As homogeneizações de amostras foram realizadas no agitador de tubos AP56, da Phoenix, ou no agitador magnético da Fisatom.

O destilador utilizado foi da marca Quimis e deionizador da Water Pro PS, marca Labconco.

### **4.3. Microrganismos**

Os quatro isolados fúngicos, obtidos de diferentes espécimes vegetais (graviola, manga, pinha e laranja), foram morfológicamente identificados como *Lasiodiplodia theobromae* pela Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Menezes da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco). Posteriormente foram molecularmente classificados como *Botryosphaeria rhodina* (forma anamórfica) e denominados *B. rhodina* MMGR (isolado de graviola, *Annona muricata*), *B. rhodina* MMMFR (manga, *Mangifera* sp.), *B. rhodina* MMPI (pinha, *Annona squamosa*), e *B. rhodina* MMLR (isolado de laranja, *Citrus* sp.) (SALDANHA et al., 2007).

#### **4.3.1. Manutenção dos microrganismos**

Os fungos foram mantidos em tubos inclinados contendo meio batata-ágar-dextrose (BDA) a 4°C e repicados trimestralmente.

#### **4.4. Cultivos microbianos para obtenção dos exopolissacarídeos (EPS)**

##### **4.4.1. Preparo do inóculo**

Para o preparo do inóculo, os fungos foram transferidos para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) acrescido de glucose 1% (m/v) como fonte de carbono e 2% de ágar(m/v). As placas foram incubadas durante 5 dias a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  em estufa bacteriológica. Após este período, pequenas porções de hifas foram transferidas para três frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio mínimo líquido de Vogel, com 0,5% (m/v) de glucose, mantendo-se a proporção 5:1 de ar:meio. Os frascos foram mantidos sob agitação a 180 rpm,  $28\pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas. Decorrido este tempo, os micélios fúngicos foram triturados em um homogeneizador de células (blender) durante 30 segundos. A seguir, o homogenato de células obtido foi centrifugado durante 20 minutos a 7000xg. Os sobrenadantes foram decantados e o precipitado (massa celular) ressuspenso em solução salina fisiológica estéril, até se obter um valor de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm, de acordo com curva turbidimétrica padrão previamente estabelecida, para calcular a concentração de células necessárias para a produção dos exopolissacarídeos.

##### **4.4.2. Produção dos exopolissacarídeos (EPS)**

Os cultivos foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyer de 2000 mL, em triplicata, contendo 400 mL de meio de Vogel e 5% (m/v) de sacarose comercial como fonte de carbono, mantendo-se a proporção 5:1 de ar:meio. Cada frasco foi inoculado com 16 mL da suspensão de células em salina fisiológica estéril (1 mL de homogenato para cada 25 mL de meio). Os cultivos foram incubados a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  por 72 horas.

#### 4.4.3. Interrupção dos cultivos e recuperação dos EPS

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (7000g/20 min) a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados em banho de gelo, tratados com três volumes de etanol absoluto gelado a 4°C, para precipitação dos exopolissacarídeos. Depois de mantidos “*overnight*” em câmara fria a 4°C, os precipitados de EPS foram novamente centrifugados (7000xg/20 min), para retirar o excesso de etanol, ressuspensos em água deionizada, sob agitação constante e dialisados exaustivamente contra água destilada. Retirou-se então uma alíquota de 5 mL de cada material, para as quantificações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas.

O restante de cada material foi congelado e liofilizado para as demais análises, tendo a sua massa calculada em gramas, considerando-se também os valores das alíquotas de 5 mL.

Os exopolissacarídeos produzidos pelos fungos *Botryosphaeria rhodina* MMGR, *Botryosphaeria rhodina* MMMFR, *Botryosphaeria rhodina* MMPI e *Botryosphaeria rhodina* MMLR foram denominados, respectivamente, EPS<sub>GRAVIOLA</sub>, EPS<sub>MANGA</sub>, EPS<sub>PINHA</sub> e EPS<sub>LARANJA</sub>.

### 4.5. Métodos analíticos

#### 4.5.1. Determinação dos açúcares totais

O método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi utilizado para detectar e quantificar a concentração de carboidratos totais em cada amostra, durante todo o trabalho. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor amarela.

Para calcular a concentração de carboidratos foi feita uma curva padrão de glucose (0,1 g%) na faixa de concentração de 10 a 100  $\mu\text{g}$ , com as leituras realizadas em espectrofotômetro a 490 nm.

#### **4.5.2. Determinação dos açúcares redutores**

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

Para calcular a concentração de açúcares redutores nas amostras, foi usada uma curva padrão de glucose 0,1 g%. A curva de calibração foi desenvolvida na faixa de concentração de 10 a 100  $\mu\text{g}$ , com as leituras realizadas em espectrofotômetro a 540 nm.

#### **4.5.3. Determinação de proteínas**

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

A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de calibração com albumina bovina (BSA), na faixa de concentração de 5 a 50  $\mu\text{g}$ , com as leituras realizadas em espectrofotômetro a 595 nm.

#### 4.5.4. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sepharose CL-4B

O gel Sepharose CL-4B é formado por agarose, numa concentração aproximada de 4%, estabilizado por pontes de hidrogênio. Possui faixa de fracionamento de  $6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$  para proteínas e  $10^4 - 1 \times 10^7$  para polissacarídeos (BOYER, 1993).

A coluna de vidro utilizada (1,5x30 cm) apresentou volume aproximado de 47 mL. A H<sub>2</sub>O destilada foi utilizada como eluente, sendo o fluxo de 0,5 mL/min e o volume coletado por fração de 1,5 mL. Foram utilizados 500 µg de cada material, solubilizados em 1 mL de água deionizada e aplicados a coluna. Antes de cada material foi aplicado 500µL de uma solução 1mg/mL de Blue Dextran, que é uma dextrana com elevada massa molecular cuja função é determinar o volume morto da coluna.

O experimento ocorreu em ambiente climatizado ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e as frações coletadas foram transferidas à temperatura de  $4^\circ\text{C}$ .

#### 4.5.5. Hidrólise ácida total

As amostras (50 µg em açúcares totais de cada um dos EPS) foram preparadas em tubos próprios para hidrólise, e após congeladas e liofilizadas, foram submetidas a hidrólise.

A hidrólise ácida foi efetuada pela adição de 300 µl de TFA (ácido trifluoracético) 5M a cada uma das amostras preparadas (EPS). Antes da hidrólise os tubos foram purgados com gás nitrogênio, para substituição do oxigênio, por aproximadamente 1 minuto, hermeticamente selados e então colocados em bloco de aquecimento à  $100^\circ\text{C}$  por 16 horas (BARBOSA et al., 2003). O ácido foi removido por evaporação em centrifuga a vácuo (Heto-DNA Plus), os hidrolisados lavados quatro vezes em água deionizada e então solubilizados em 250 µl de água deionizada e analisados por HPAEC/PAD.

#### **4.5.6. Análise da composição monossacarídica dos EPS por cromatografia líquida de alta pressão em troca aniônica (HPAEC)**

A análise de monossacarídeos de cada hidrolisado foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC), utilizando um sistema Dionex DX500 e um detector de amperimetria pulsada (PAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocraticamente (NaOH 14 mM), usando coluna analítica CarboPac PA1 (4x250 mm) equipada com guarda coluna PA1 ao fluxo de 1.0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas utilizando H<sub>2</sub>O deionizada (eluyente 1) e NaOH 200 mM (eluyente 2) preparado a partir de uma solução de NaOH 50% (m/v). (CORRADI DA SILVA , et al., 2005)

A coluna foi lavada com o eluyente 2 por aproximadamente uma hora antes das eluições. Para a aplicação de cada hidrolisado, a coluna foi equilibrada por um período de 15 minutos nas mesmas condições da corrida (NaOH 14 mM) e em seguida uma alíquota de 25 µL contendo 1 µg de cada material foi injetada, procedendo-se então a corrida cromatográfica por 25 minutos. Após a análise, a coluna foi regenerada por 10 minutos com 100% do eluyente 2.

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

#### **4.5.7. Espectroscopia no infravermelho acoplado ao transformador Fourier (FT-IR)**

Esta análise foi efetuada para confirmar a configuração anomérica das ligações glicosídicas dos polissacarídeos e acompanhar as reações de metilação, pelo desaparecimento das bandas de hidroxila e o aparecimento da banda de metila. A espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier foi realizada usando o espectrômetro BRUKER modelo Vector 22.

Uma alíquota de 1 mg de cada EPS liofilizado, tanto natural quanto metilado, foi macerado com 250 mg de KBr. As pastilhas utilizadas para a análise foram feitas com uma pressão de 5 toneladas por 75 segundos. As análises foram conduzidas na faixa de 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$  em uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.5.8. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C)**

Os espectros de RMN - <sup>13</sup>C dos exopolissacarídeos foram utilizados para identificar a configuração anomérica e a posição das ligações glicosídicas.

Para tal análise, os espectros dos materiais em estudo foram comparados aos espectros de padrões, normalmente encontrados na literatura de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (GORIN, 1981). Os espectros foram obtidos em aparelho Bruker DRX-400 incorporado ao transformador Fourier. Os exopolissacarídeos (15mg) foram solubilizados em solução DMSO deuterado.

As soluções (1mL) contidas em cilindros coaxiais foram introduzidas em tubos de 100 x 10 mm d.i. e mantidas a 30 °C para serem analisadas. Os espectros foram obtidos em 400 MHz em relação ao núcleo de <sup>1</sup>H (90,56 MHz em relação ao núcleo de <sup>13</sup>C). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm, relativos à ressonância do Me<sub>4</sub>Si ( $\delta=0$ ) determinada em experimento separado.

#### **4.5.9. Metilação dos EPS produzidos pelos diferentes isolados do gênero *Botryosphaeria***

Os exopolissacarídeos produzidos foram metilados utilizando as técnicas de Haworth (1915) e Ciucanu e Kerek (1984).

No procedimento de Haworth 10 mg de cada EPS foi solubilizado em 20 mL de água destilada, com o uso de agitação magnética vigorosa e ciclos de



aquecimento (50 a 60°C) alternando com ultra-som (2 x por dia) até completa solubilização (cerca de dois dias). As amostras foram então reduzidas com boroidreto de sódio por 16 horas, controlando-se o pH para 9,0. Após este período de tempo, as amostras foram neutralizadas com ácido acético (2M), em banho de gelo, e então dialisadas em água corrente por 24 horas, evaporadas até secura, transferidas para balões volumétricos e então solubilizadas em 20 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 40%(m/v) sob agitação magnética. Realizou-se então 10 adições de 1 mL de sulfato de dimetila (DMS), com intervalos de 20 minutos entre cada adição. Os materiais foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. A metilação foi interrompida por aquecimento a 100°C, durante 30 minutos, para a decomposição do excesso de DMS. Em seguida as amostras foram resfriadas em banho de gelo, neutralizadas com ácido acético 2M, dialisadas contra água corrente por 72 horas e contra água destilada por 36 horas e então os polissacarídeos parcialmente metilados foram liofilizados para a realização da segunda técnica de metilação.

Para o método de Ciucanu e Kerek as amostras de 6 mg de cada um dos EPS parcialmente metilados pelo procedimento de Haworth foram dissolvidas separadamente em 2,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), com o uso de agitação magnética vigorosa em banho maria (60 a 65 °C) alternando com ultra-som (2x por dia) até completa solubilização. Adicionou-se então 40,0 mg de hidróxido de sódio (na forma de micro pérolas) à cada amostra, mantendo-se sob agitação por mais 15 minutos, adicionando-se em seguida 0,2 mL de iodeto de metila, com mais 30 minutos de agitação vigorosa.

A reação foi interrompida com a adição de água destilada gelada. Para a extração de cada material metilado adicionou-se clorofórmio gelado, ocorrendo a formação de duas fases, uma aquosa e outra clorofórmica. A fase orgânica, contendo o material, foi separada da aquosa e lavada três vezes com pequenas porções de água destilada gelada, as quais foram desprezadas. A água residual foi removida utilizando-se sulfato de sódio e a fase clorofórmica filtrada em algodão. Todo procedimento foi realizado mais 2 vezes para assegurar total metilação. Do filtrado final foi então separada uma alíquota (correspondente a 1,0

mg) para análise do processo de metilação por FT-IR e o restante evaporado e preparado para hidrólise.

#### **4.5.10. Hidrólise, redução e acetilação dos polissacarídeos metilados**

Após os procedimentos de metilação, os materiais foram hidrolisados, reduzidos e acetilados para posterior análise de cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS).

Os polissacarídeos metilados foram adicionados 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% (v/v) a cada um dos metilados completamente secos, previamente separados em tubos de hidrólise, sob banho de gelo, agitando-se por 1 hora para solubilização, com conseqüente adição de 4,0 mL de água destilada. Os tubos de hidrólise foram levados à estufa pré-aquecida a 100±2 °C por 18 horas (BOUVENG et al., 1965). Após este tempo, os materiais foram transferidos para novos recipientes e neutralizados com carbonato de bário sob agitação magnética, até pH neutro. Os hidrolisados foram então filtrados, os resíduos exaustivamente lavados com água destilada e concentrados a ±10,0 mL em um evaporador rotativo a baixa pressão.

Os materiais concentrados foram tratados com resina Amberlit IRA 120 (catiônica) para remoção dos íons bário, sendo filtrados novamente para separação da resina.

Os monossacarídeos parcialmente metilados presentes nas soluções resultantes foram então reduzidos com boridreto de sódio e deixados em repouso "overnight". Após este período, as amostras foram novamente tratadas com resina catiônica, para remoção dos íons sódio, sendo então filtradas e evaporadas até a secura. Em seguida, foram lavadas com metanol e evaporadas para remoção do boridreto na forma de borato de metila. Foram realizadas 4 lavagens com metanol para cada material.

Para a obtenção dos acetatos de alditóis adicionou-se aos materiais secos e parcialmente metilados anidrido acético e piridina na proporção de 1:1

(CORRADI DA SILVA et al., 1993), deixando em repouso durante 16 horas. A reação foi interrompida com a adição de gelo picado.

Os materiais foram então transferidos para Erlenmeyers, adicionando-se cerca de 10,0 mL de clorofórmio para a extração do material acetilado. As duas fases formadas, aquosa e clorofórmica, foram separadas e a clorofórmica lavada com pequenas porções de uma solução de sulfato de cobre 2% (m/v) para a remoção da piridina. Após a lavagem, os materiais foram tratados com sulfato de sódio anidro, filtrados e estes transferidos para pequenos frascos âmbar, que foram deixados a temperatura ambiente para a evaporação do clorofórmio. Os acetatos de alditóis resultantes foram então enviados para análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS).

#### **4.5.11. Análise da estrutura conformacional dos EPS**

Esta técnica permite de um modo simples detectar a existência ou não da conformação em tripla hélice através da complexação do corante Vermelho Congo com a estrutura do EPS, procedimento descrito por Ogawa e colaboradores (1972).

Com cada EPS preparou-se uma solução denominada CR/EPS misturando-se a solução de Vermelho Congo (910 $\mu$ M) e a solução de EPS (1mg/mL) na proporção de 1:10. Separou-se 10 alíquotas de 1mL e adicionou-se a solução NaOH 5M e H<sub>2</sub>O deionizada variando a concentração de NaOH de 0 a 0,4M em um volume final de 1,1 mL por tubo, como observado na tabela 1. Os tubos foram deixados em repouso por 3 horas e após esse tempo fez-se a varredura do espectro no intervalo de 470 a 540 nm. O padrão utilizado foi de dextrana (65 a 74 kDa)

Tabela 1: Ensaio analítico para a formação do complexo CR/EPS.

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

#### 4.6. Derivatização química por sulfatação do EPS<sub>LARANJA</sub>

O EPS<sub>LARANJA</sub>, produzido pelo *Botryosphaeria rhodina* MMLR (isolado de laranja, *Citrus* sp.), foi derivatizado quimicamente através de uma reação de sulfatação conforme descrito por O'Neill (1955) com modificações. Foram pesadas 10 alíquotas de 50,0 mg do EPS e em seguida cada porção foi dissolvida em 10,0 mL de formamida com o uso de agitação magnética vigorosa em ciclos de aquecimento (50 a 60 °C) alternando com ultra-som.

Foram então adicionados 10,0 mL de piridina (catalisador) ao meio da reação de cada alíquota, mantendo-se sob agitação por mais 30 horas, visando total solubilização do material.

Em seguida adicionou-se 4,0 mL de ácido clorossulfônico gota a gota, tomando-se os devidos cuidados para evitar a hidratação do sistema reacional, que foi mantido sob agitação a 4°C overnight. As reações foram interrompidas com a adição de 20,0 mL de água destilada gelada, neutralizadas com uma solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v), até não haver mais desprendimento de gás e então

dialisadas contra água corrente por 48 horas e contra água destilada por 96 horas em sacos de diálise apropriados (12.000 Da).

Após este período, os volumes foram concentrados em um evaporador rotativo a baixa pressão e liofilizados, para posterior determinação do grau de substituição (D.S.). O procedimento de sulfatação foi repetido mais duas vezes, totalizando três reações, para obtenção de valores de D.S. iguais ou maiores que 0,8. O acompanhamento da reação de sulfatação foi realizado através de FT-IR e UV-Vis.

Os espectros de absorção foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu 1601 UV-Vis, onde foram utilizadas soluções do EPS antes e após cada reação de sulfatação, na concentração de 1mg/mL, no intervalo de 190 a 600 nm.

Os espectros de infravermelho foram obtidos no modo transmitância utilizando um espectrômetro marca Bruker modelo Vector 22. Para esta análise foram utilizadas pastilhas de KBr (250 mg) com o EPS (1 mg), antes e após cada reação de sulfatação.

#### **4.6.1. Determinação do grau de substituição (D.S.)**

O grau de substituição do EPS<sub>LARANJA SULFATADO</sub> (D.S.) foi determinado através do método turbidimétrico, empregando o reagente cloreto de bário-gelatina, descrito por Dodgson e Price (1962).

Amostras de 4 mg do EPS<sub>LARANJA SULFATADO</sub> foram hidrolisadas com 4 mL de ácido clorídrico 1M por 5 horas a 100°C. Após a hidrólise, uma alíquota de 0,2 mL do hidrolisado foi adicionada a 3,8 mL de TCA a 3% (m/v) e 1 mL de solução protetora recém preparada. A solução protetora foi preparada dissolvendo-se 6 g de cloreto de sódio em 20 mL de água destilada com 0,5 mL de HCl concentrado e 2,5 mL de gelatina a 1% (m/v). A mistura reacional foi agitada por 1 minuto e deixada

em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente e depois realizada a leitura espectrofotométrica a 360nm.

A determinação do D.S. foi feita através da seguinte fórmula:

$$\text{D.S.} = 162 \times S / (3200 - 102 \times S) \text{ (para hexoses), onde:}$$

162 - representa 1 mol da unidade repetitiva (hexose)

3200 - representa a massa atômica do enxofre (32g x 100)

102 - representa 1 mol do éster substituinte (SO<sub>3</sub>Na)-1

S - representa o teor de enxofre em porcentagem.

A porcentagem de enxofre na molécula foi determinada através da relação, previamente descrita por Whistler e Spencer, 1964:

$$\%S = (\text{BaSO}_4, \mu\text{g}) \times 0,1374 \times 100 / (\text{massa amostra sulfatada}, \mu\text{g})$$

O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva de calibração de íons sulfato (0, 005 g%) na faixa de concentração de 20 a 180 µg

#### 4.7. Atividade anticoagulante *in vitro*

Para analisar o potencial anticoagulante do EPS<sub>LARANJA SULFATADO</sub> foram realizados os testes clássicos de atividade anticoagulante TT (tempo de trombina), PT (tempo de protrombina) e APTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) de acordo com os protocolos presentes nos Kits da marca Wiener (APTT e TT) e *In Vitro* Diagnóstica (TT), utilizando a heparina sódica (5000 UI/mL) como padrão.

Os ensaios foram conduzidos com as amostras (EPS<sub>LARANJA</sub> e EPS<sub>LARANJA SULFATADO</sub> 0-200 µg/mL) e o padrão (heparina 0-30 µg/mL) solubilizados em salina fisiológica (0,9% m/v). O plasma humano foi obtido da centrifugação de sangue de doadores saudáveis (1000xg, 20 minutos). Para os controles, a salina fisiológica foi adicionada ao plasma sanguíneo em uma proporção de 1:10 (10 µl de

salina e 90  $\mu\text{L}$  de plasma), sendo esta mesma proporção mantida para as diferentes concentrações utilizadas para as amostras (Tabela 2):

Tabela 2: Concentrações finais das amostras e do padrão nos diferentes ensaios de atividade anticoagulante.

<b>EPS<sub>LARANJA</sub></b>	<b>EPS<sub>LARANJA</sub> sulfatado</b>	<b>Heparina</b>
1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$
10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$
15 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$	
20 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	
	30 $\mu\text{g/mL}$	
	40 $\mu\text{g/mL}$	

#### 4.7.1. Teste de protrombina (PT)

O tempo de protrombina mede o tempo de coagulação do plasma depois de se adicionar uma fonte de fator tissular (tromboplastina) e cálcio. A recalcificação do plasma na presença de fator tissular gera o Fator X ativado e posteriormente um coágulo de fibrina. A figura 3 apresenta o princípio do teste de protrombina.

As amostras e controles foram ensaiados em triplicada. A cada tubo pré-aquecido (37°C) foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da mistura plasma/amostra (10  $\mu\text{L}$  das amostras ou padrão - nas diferentes concentrações) - ou salina 0,9% e 90  $\mu\text{L}$  plasma). Os tubos foram então incubados à 37°C por 3 – 5 minutos e em seguida adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de reagente (previamente aquecido e reconstituído com 2 mL de água deionizada estéril). Imediatamente após a adição do reagente, o cronômetro foi adicionado para registrar o tempo gasto para a formação do coágulo.

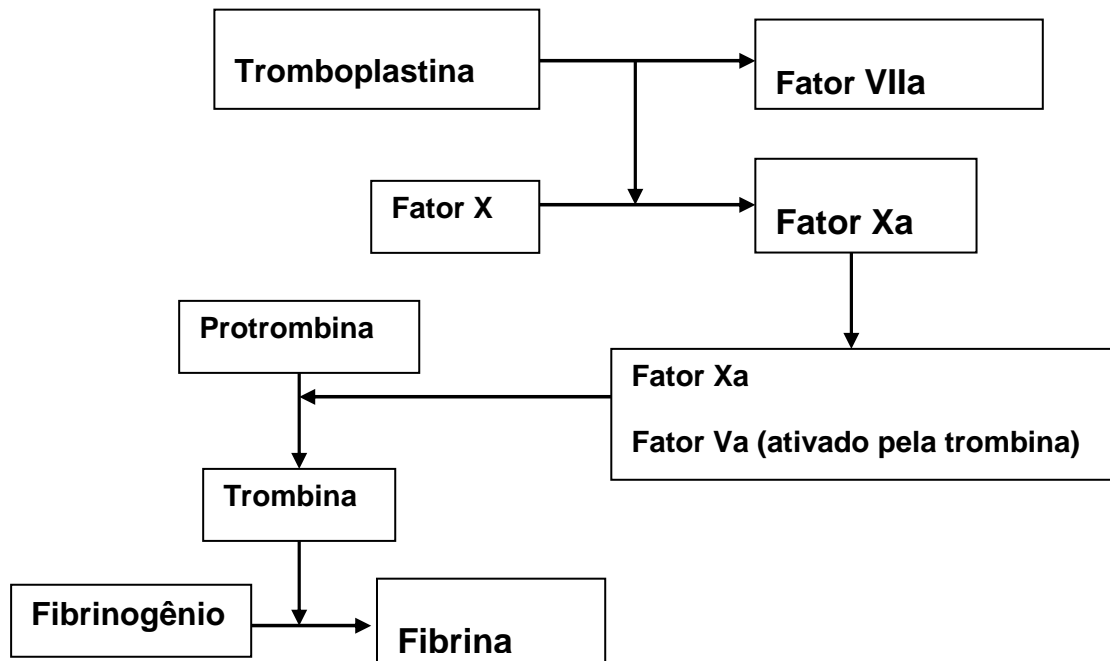


Figura 3 – Esquema representativo do princípio do teste de tempo de protrombina (SILVA, HASHIMOTO, 2006 modificado por MENDES, 2008).

#### 4.7.2. Teste de tromboplastina parcial ativada (APTT)

Este teste é considerado mais demorado, pois deve ocorrer ativação da fase-contato para posterior desencadeamento da via intrínseca da coagulação. Este teste contém um ativador plasmático e fosfolípidios que atuam como substituinte das plaquetas. A mistura reacional deve ser recalcificada e a formação do coágulo cronometrada. O princípio do teste é representado na figura 4.

As amostras e controles foram ensaiados em triplicada. A cada tubo pré-aquecido (37°C) foram adicionados 100 µL da mistura plasma/amostra (10 µL das amostras ou padrão - nas diferentes concentrações - ou salina 0,9% e 90 µL plasma) e 100 µL do reagente específico. Os tubos foram então incubados à 37°C por 3 – 5 minutos e em seguida foram adicionados 100 µL de cloreto de cálcio. Os tubos foram então agitados brevemente, e cronometrou-se o tempo gasto para a formação do coágulo.



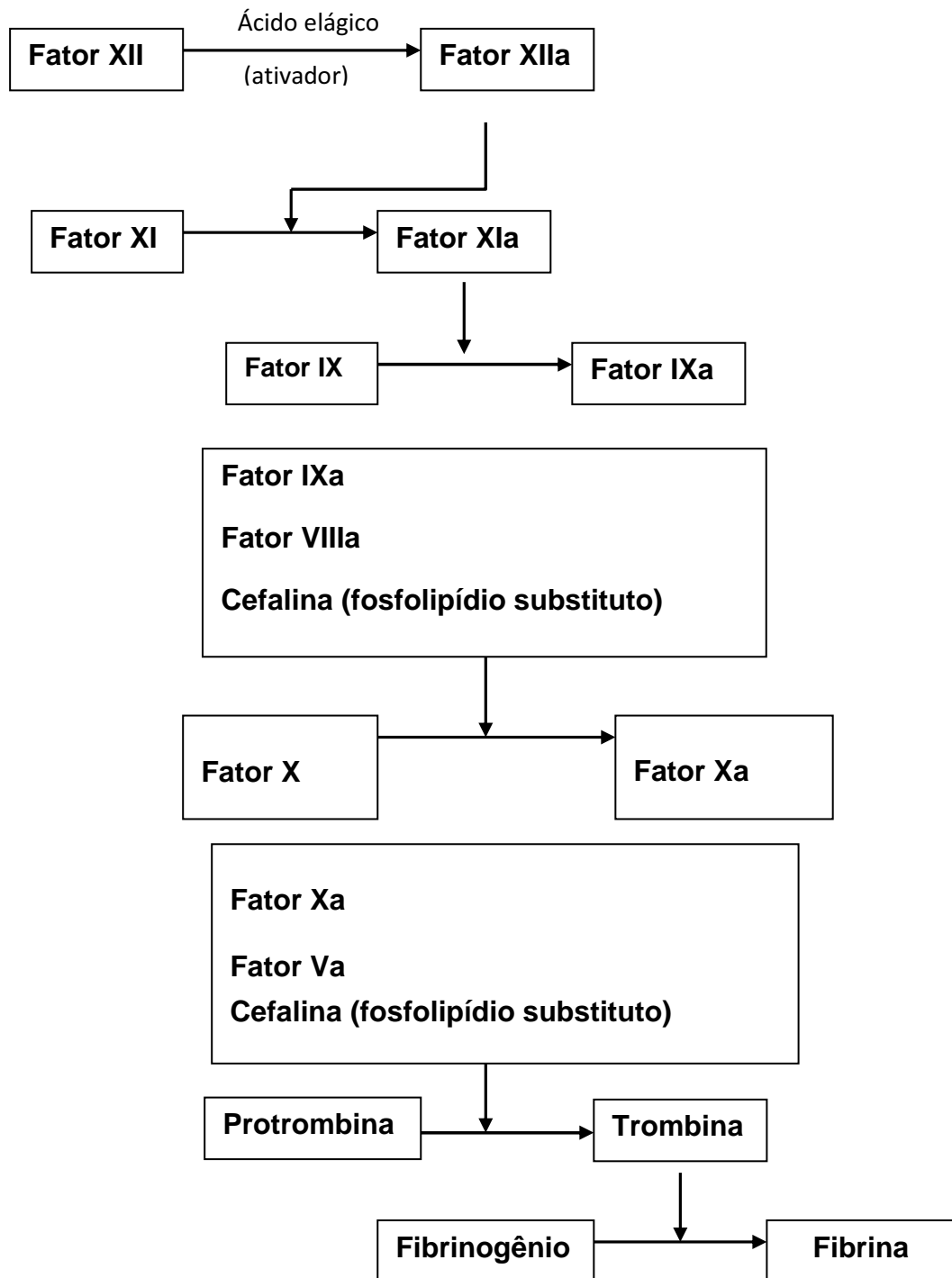


Figura 4 – Esquema representativo do princípio do teste de tempo parcial de tromboplastina ativada (SILVA, HASHIMOTO, 2006 modificado por Mendes, 2008).

#### 4.7.3. Teste de trombina (TT)

O Tempo de Trombina é um teste simples de *screening* para condições que possam interferir na conversão de fibrinogênio em fibrina. Uma trombina de baixa potência é adicionada ao plasma e a formação do coágulo é cronometrada.

As amostras e controles foram ensaiados em triplicada. A cada tubo pré-aquecido (37°C) foram adicionados 200 µL da mistura plasma/amostra (20 µL das amostras ou padrão nas diferentes concentrações ou salina 0,9%(m/v) e 180 µL plasma). Os tubos foram então incubados à 37°C por 3 – 5 minutos, e em seguida foram adicionados adicionou-se 100 µL de reagente. Imediatamente após a adição do reagente, o cronômetro foi acionado para registrar o tempo gasto para a formação do coágulo.

#### 4.7.4. Inibição da trombina (IIa) pela antitrombina (AT) :

A inibição da Trombina (IIa) pela Antitrombina (AT) na presença do EPS<sub>LARANJA</sub>, EPS<sub>LARANJA-SULFATADO</sub> e heparina (padrão de referência) foi avaliada através do ensaio da atividade amidolítica da trombina utilizando substrato cromogênico, de acordo com a metodologia descrita por Mello e colaboradores (2004) como modificações. Foram realizados testes com plasma humano (como fonte de antitrombina e de outros cofatores, como o cofator II da heparina), e com a antitrombina (AT) purificada (Haematologic Technologies). Os testes foram realizados, em duplicata, com várias concentrações de EPS<sub>LARANJA</sub>, EPS<sub>LARANJA-SULFATADO</sub> e heparina conforme descrito abaixo.

Diferentes concentrações de EPS<sub>LARANJA</sub>, EPS<sub>LARANJA-SULFATADO</sub> (de 0 a 400 µg/mL) e heparina (0 a 1 µg/mL) foram incubadas, separadamente, em microcubetas por 60 segundos a 37°C com 10 µl de trombina (20 nM - Haematologic Technologies), 25 µl de plasma humano ou AT purificada (40 nM) e tampão TS/PEG (Tris/HCl 0,02M, NaCl 0,15 M e polietileno glicol 1,0 mg/ml, pH 7,4). Após o período de incubação, 25 µl do substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix AB) em tampão

TS/PEG foram adicionados e a absorvância foi medida em 405 nm em um leitor de microcubetas Thermo-max (Figura 6) por 5 minutos. A taxa de variação na absorvância, expressa como  $A_{405}/\text{min}$ , foi proporcional a atividade remanescente da trombina no meio reacional. Não ocorreu inibição da trombina nos experimentos controle, que foram realizados incubando-se a trombina com a AT purificada ou com o plasma humano na ausência dos polissacarídeos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1. Produção e quantificação dos EPS pelos diferentes isolados do gênero *Botryosphaeria* obtidos de espécimes vegetais (graviola, manga pinha e laranja)

A produção de polissacarídeos microbianos pode ser influenciada por fatores físicos e químicos, como temperatura, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, aeração, agitação e a presença de micro elementos. A escolha da cepa fúngica também interfere na produção. Esses parâmetros podem determinar diferenças no rendimento das moléculas produzidas bem como em suas características químicas e reológicas (BARBOSA et al., 2004).

Muitos microrganismos produtores de polissacarídeos respondem de maneira diferente a esses fatores de crescimento e para alguns, a fonte de carbono é a principal determinante da quantidade e qualidade do polissacarídeo formado (CORRADI DA SILVA et al., 2006). Diferentes fontes de carbono podem dar origem a polímeros bioativos similares, com diferentes graus de ramificação e polimerização (ZHANG et al., 1995; JIN et al., 2003; CORRADI DA SILVA et al., 2005).

Selbmann e colaboradores (2002) estudaram diferentes condições de produção de exopolissacarídeos pelos fungos *Sclerotium gluconicum* NRRL 3006 e *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 utilizando derivados de amido como substrato. Os resultados mostraram que os fungos produziram EPS em todos os substratos testados, principalmente em amido de milho hidrolisado e especialmente o *B. rhodina*. Steluti e colaboradores (2004) comparando diferentes fontes de carbono, principalmente monoméricas e diméricas, concluíram que o exopolissacarídeo botriosferana, sintetizado pelo *B. rhodina* MAMB-05, teve sua produção favorecida em sacarose como única fonte de carbono.

As condições de cultivo que foram utilizadas para a obtenção dos EPS produzidos pelos isolados seguiram aquelas utilizadas para o *B. rhodina* MAMB-05 (BARBOSA et al., 2003, CORRADI DA SILVA et al., 2005; GIESE et al., 2008).

Este microrganismo tem sido estudado em relação a produção de diferentes enzimas, principalmente lacases (BARBOSA et al., 1995; BARBOSA et al. 1996; VASCONCELOS et al. 2000; DEKKER, BARBOSA, 2001) e mais recentemente, quanto a sua característica de produção de exopolissacarídeos (BARBOSA et al., 2003; STELUTI et al., 2004; CORRADI DA SILVA et al., 2005). Para os estudos enzimáticos, o inóculo utilizado consistia de esferas de meio mínimo de Vogel (1956) sólido contendo micélio do microrganismo. Entretanto, estudos preliminares realizados por Pigatto (2002), demonstraram que esse tipo de inóculo não era apropriado para a produção de exopolissacarídeos, pois os EPS secretados para o meio de cultivo continuavam agregados as esferas de meio, formando uma massa sólida, o que tornava difícil a quantificação e análise química do material obtido. Por isso Barbosa e colaboradores (2003), padronizaram o inóculo, sendo este o procedimento adotado em trabalhos subseqüentes de purificação e caracterização do EPS do ascomiceto (STELUTI et al, 2004; CORRADI DA SILVA et al, 2005) e agora para a análise de produção deste biopolímero por outros isolados do mesmo gênero.

Os isolados obtidos das diferentes fontes vegetais (graviola, manga pinha e laranja), foram cultivados em sacarose comercial como única fonte de carbono. Esta fonte de carbono foi escolhida primeiro levando-se em consideração seu baixo custo e fácil aquisição, e também por já ter apresentado resultados satisfatórios na produção de exopolissacarídeo pelo *B. rhodina* MAMB-05 (STELUTI et al., 2004).

O primeiro passo do trabalho foi o cultivo microbiano para a produção dos EPS, visando determinar qual das cepas fúngicas seria o melhor produtor. A determinação de rendimento foi realizada através da análise dos açúcares totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico, utilizado por diferentes autores, como uma forma eficiente de quantificação de exopolissacarídeos no meio de cultivo (YUROLOVA, HOOG, 1997; DE VUYST et al., 1998; RUIJSSENAARS et al., 2000; RUAS-MADIEDO, LOS REYES-GAVILAN, 2005). Essa quantificação foi realizada após diálise exaustiva do material para retirada de qualquer resquício de substâncias, como o etanol utilizado para precipitação dos polissacarídeos ou outras moléculas residuais do meio de cultivo, tais como a fonte de carbono, que pudessem comprometer a análise e o resultado final do experimento.

Steluti e colaboradores (2004) citam a importância de determinar a quantidade de açúcares redutores nas amostras, pois o procedimento de quantificação pelo fenol-ácido sulfúrico somente é válido quando o açúcar residual, ou seja, a fonte de carbono utilizada é próximo de zero, com o resultado desta diferença representando o EPS produzido. Análises de proteínas também foram realizadas para determinar presença de contaminantes protéicos.

Os materiais obtidos foram pesados e, os valores encontrados assim como os das quantificações, estão apresentados na tabela 2.

Os resultados observados para quase todos os fungos, com exceção do isolado de manga, demonstraram uma concentração significativa de EPS, confirmada pelo rendimento em açúcares totais e pelo baixo percentual de açúcares redutores. Os valores encontrados para peso seco confirmam aqueles de açúcares totais (Tabela 3).

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

Tabela 3: Peso seco (liofilizado) e quantificações de açúcares totais, açúcares redutores e proteínas dos EPS produzidos pelos isolados do gênero *Botryosphaeria* obtidos de diferentes fontes vegetais (laranja, manga, graviola, pinha) crescidos em sacarose comercial como única fonte de carbono.

	Peso Seco (g/L)	Açúcar Redutor (g)	Açúcar Total (g)	Proteínas (g)	Açúcar Total %	Proteínas %
<b>EPS<sub>GRAVIOLA</sub></b>	1,289	0,013	1,234	0,054	95	5,0
<b>EPS<sub>IMANGA</sub></b>	0,282	0,006	0,319	0,016	92,4	7,6
<b>EPS<sub>PINHA</sub></b>	1,100	0,012	1,084	0,015	97,6	2,4
<b>EPS<sub>LARANJA</sub></b>	1,510	0,008	1,500	0,007	99	1,0

A produção mais significativa de exopolissacarídeo foi observada para o microrganismo obtido de laranja (produzindo o EPS<sub>LARANJA</sub>), apresentando 99% de açúcar total, seguido pelos isolados de pinha (EPS<sub>PINHA</sub>) e graviola (EPS<sub>GRAVIOLA</sub>) (97,6 %, e 95%, respectivamente) demonstrando o potencial desses três fungos como bons produtores de polissacarídeos, com ênfase para o isolado de laranja. Os valores determinados do EPS<sub>MANGA</sub> demonstram que para o fungo produtor deste exopolissacarídeo as condições adotadas foram pouco eficientes. E isso por um lado é interessante, pois indica que realmente as condições nutricionais afetam a produção polissacarídica. Esses resultados também podem indicar que no ambiente natural o tipo de EPS produzido pode variar de acordo com o tipo de hospedeiro escolhido pelo fitopatógeno. Para dados mais conclusivos seria necessário estudos de aperfeiçoamento do processo de cultivo assim como de patogenicidade desses organismos, para verificar se existe mesmo essa relação entre o hospedeiro e o tipo de EPS produzido; entretanto, isto no momento não é um dos objetivos deste trabalho, mas que pode ser levado em consideração para trabalhos futuros.

Em relação à quantificação de proteínas, apesar dos valores muito baixos quando comparados à massa total, a presença de componentes protéicos pode ser atribuída, provavelmente, a proteínas secretadas no meio de cultivo, como por exemplo a lacase, produzida constitutivamente pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (DEKKER; BARBOSA, 2001) e também pelos isolados, como determinado por Saldanha e colaboradores (2007), quando analisaram o perfil de enzimas líticas por estes fungos.

Além de um bom rendimento em relação à produção de EPS pelas cepas escolhidas, é necessário que as moléculas produzidas estejam puras e homogêneas para que possam ser aplicadas biotecnologicamente. Assim, as etapas subsequentes estão relacionadas com processos para verificar grau de pureza para posterior caracterização química. Estudos foram realizados com os EPS produzidos por todos os microrganismos e os resultados são mostrados a seguir.

## **5.2. Análise de homogeneidade dos EPS produzidos pelos diferentes isolados através de cromatografia de exclusão molecular**

A cromatografia de exclusão molecular é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de homogeneidade de materiais polissacarídicos, pois separam as moléculas de acordo com a massa molecular aparente. Este processo baseia-se na ordem de eluição que é diretamente proporcional ao tamanho das moléculas (BOYER, 1993). No procedimento, a preparação é passada através de uma coluna preenchida com gel e os eluatos são analisados para carboidratos. A simetria no pico de eluição é indicativa de homogeneidade (SUN et al, 2005; CORRADI DA SILVA et al., 2005; CORRADI DA SILVA et al, 2006).

Diferentes tipos de géis podem ser utilizados, dependendo do tamanho e tipo de molécula a ser analisada. Neste trabalho o gel aplicado para determinação da pureza dos materiais foi o gel de Sepharose CL-4B, que possui



faixa de fracionamento apropriada para polissacarídeos e vem sendo utilizado como sucesso para essa determinação.

É importante ressaltar que nas primeiras corridas, observou-se que após a passagem do polissacarídeo, pequenas partículas dos materiais permaneciam em suspensão sobre o gel, o que poderia acarretar em contaminação das próximas amostras que fossem passadas pela mesma coluna. Para evitar isso, foi realizada uma coluna para cada EPS, determinando o volume morto da coluna com eluição de Blue Dextran na mesma concentração. A coluna foi sempre empacotada com o mesmo tipo de gel e tentou-se manter sempre as mesmas condições de fluxo do eluente, tamanho da coluna e volume dos eluatos.

O perfil de eluição da amostra na corrida cromatográfica informa sobre a pureza do material bem como a massa molecular aparente. Isto porque, dependendo da forma do polissacarídeo, se em hélice tripla, hélice simples ou conformação ao acaso randômica, ele pode ou não entrar nos poros do gel e retardar ou acelerar o seu percurso na fase móvel (BONGIOVANI, 2008). O Blue Dextran (com massa molecular em torno de  $2 \times 10^3$  kDa ) é aplicado no gel para verificar o empacotamento da coluna, pelo perfil de eluição desse polímero, bem como para determinar o “volume morto” da coluna.

Todos os EPS em estudo foram submetidos à cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B a pressão normal, e eluíram como um pico principal após o Blue Dextran, indicando a homogeneidade das moléculas (Figura 5). Entretanto, os EPS<sub>PINHA</sub>, EPS<sub>GRAVIOLA</sub> e EPS<sub>MANGA</sub> (Figura 5a e 5c) apresentaram um pequeno ombro, que pode corresponder à presença de um contaminante, o que não foi observado para o EPS<sub>LARANJA</sub> (Figura 5d).

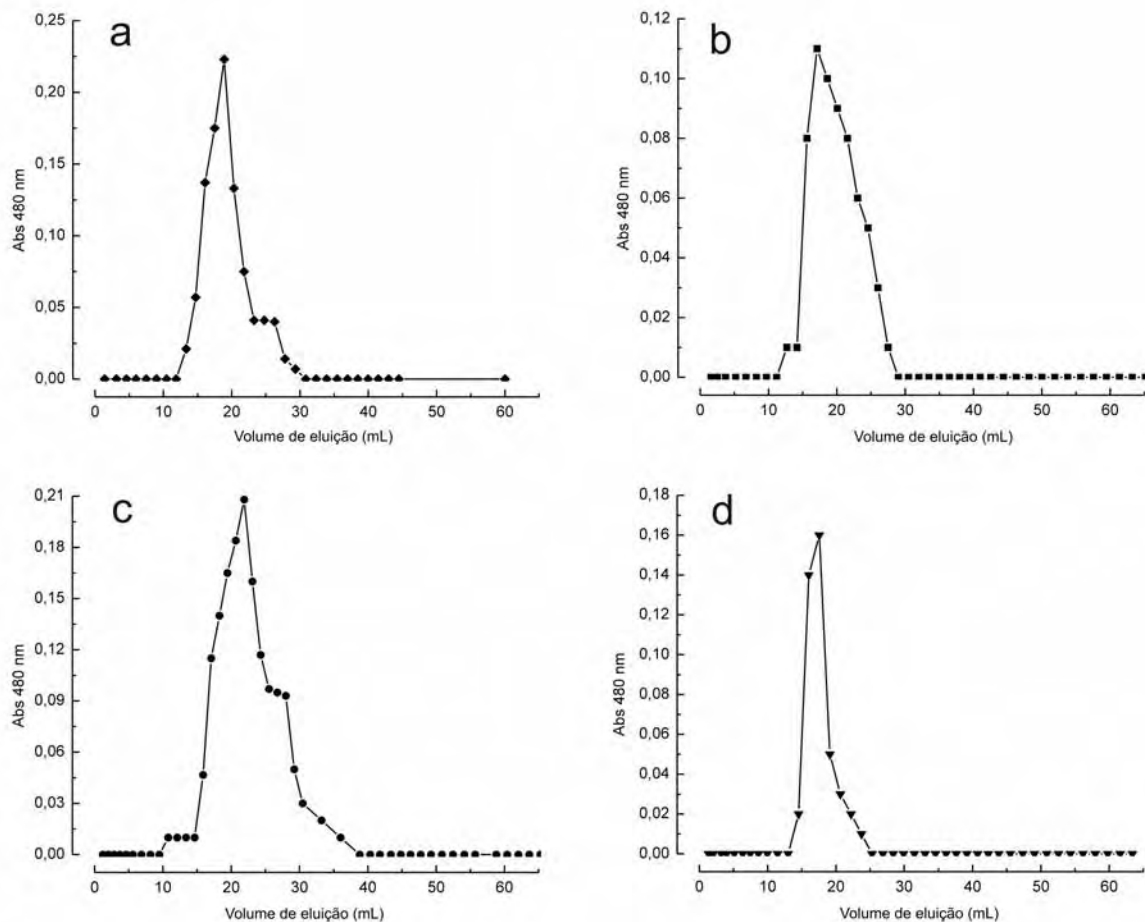


Figura 5: Cromatografia de exclusão molecular em gel Sepharose CL -4B dos EPS produzidos pelos quatro isolados de *B. rhodina* em sacarose como única fonte de carbono. Total de EPS aplicado: 0,5 mg; fluxo: 0,5 mL/min. Eluente: água; Fração: 1,5 mL; Volume da coluna: 48 mL. **a:** EPS<sub>GRAVIOLA</sub>; **b:** EPS<sub>MANGA</sub>; **c:** EPS<sub>PINHA</sub>; **d:** EPS<sub>LARANJA</sub>

A partir dos cromatogramas apresentados na figura 5 pode-se dizer que o grau de polidispersividade dos EPS<sub>GRAVIOLA</sub>; EPS<sub>MANGA</sub> e EPS<sub>PINHA</sub> é relativamente grande. Essa característica é representada pelo alargamento da base do pico. Este comportamento não foi visualizado no cromatograma do EPS<sub>LARANJA</sub>. Esses resultados são muito interessantes, pois podem demonstrar que apesar da similaridade genética entre as cepas, todas identificadas como *Botryosphaeria rhodina* (SALDANHA et al., 2007), os exopolissacarídeos por elas produzidos podem

apresentar características distintas, possivelmente influenciadas pelo ambiente natural.

Segundo Corradi da Silva e colaboradores (2006), a característica de espalhamento de moléculas na filtração em gel, retratando uma distribuição de massa molecular heterogênea, deve-se provavelmente ao processo biossintético dos polissacarídeos, cujas unidades monossacarídicas são aleatoriamente dispostas na molécula principal, diferentemente das proteínas, que seguem um molde molecular. Essa situação de síntese, sem um molde prévio, gera moléculas semelhantes com diferentes massas moleculares.

A polidispersividade é também uma característica de soluções viscosas. Considerando-se que os quatro exopolissacarídeos formam soluções aquosas viscosas, o comportamento apresentado na figura 5 deve-se em parte a isso. Exopolissacarídeos que formam soluções viscosas em água são interessantes para a aplicação industrial, principalmente em alimentos, mas podem ser de difícil administração quando utilizadas como medicamentos imunomoduladores, por exemplo.

A caracterização química dos polissacarídeos é precedida pela comprovação da homogeneidade das moléculas, portanto, considerando os resultados acima a próxima etapa desse trabalho foi determinar a composição monossacarídica de cada um dos EPS. A primeira reação é a hidrólise efetiva dos polímeros que tanto pode ser efetuada por ácido quanto por enzima (PAZUR, 1994).

### **5.3. Caracterização química dos exopolissacarídeos obtidos dos isolados do gênero *Botryosphaeria***

A caracterização química dos polímeros é um processo laborioso, pois a estrutura dos açúcares de ocorrência natural é muito diversificada e por isso é difícil definir um protocolo único para análise, principalmente para polímeros complexos. Portanto, a estrutura química é determinada após um conjunto de técnicas que, juntas, fornecem a composição monossacarídica, configuração e posição das ligações glicosídicas, etc. (FUKUDA et al., 2008 *in press*).

A primeira análise a ser realizada para a caracterização de polissacarídeos é a determinação dos componentes estruturais da molécula, ou seja, conhecer seus resíduos monossacarídicos (NELSON, COX, 2000; CORRADI DA SILVA et al, 2006).

Na determinação da estrutura primária é necessária a despolimerização total ou parcial, por hidrólise ácida ou enzimática, da molécula e estes tratamentos produzem, respectivamente, monossacarídeos ou oligossacarídeos, que são posteriormente analisados por cromatografia líquida de íons em alta pressão (HPAEC – high performance anionic exchange chromatography) acoplada a um detector de óxido-redução (amperometria integrada ou pulsada – PAD). De acordo com Lee (1996), esta técnica apresenta vantagens sobre os demais métodos cromatográficos, tais como um tempo mais curto de análise com maior sensibilidade e resolução.

Diferentes tipos de ácidos podem ser utilizados para a hidrólise de carboidratos e neste trabalho, as amostras foram hidrolisadas com ácido trifluoracético (TFA), que tem se mostrado efetivo para polissacarídeos (JOHANSSON et al., 2004; RUAS-MADIEDO, LOS REYES-GAVILAN., 2005). Uma das maiores vantagens desse ácido é a volatilidade, sendo facilmente removido do hidrolisado, por evaporação rotativa. Hidrólises efetuadas com ácidos inorgânicos como HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> devem ter suas soluções neutralizados e deionizados com resinas iônicas, antes de serem analisados por cromatografia gasosa ou líquida.

A figura 6 apresenta os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de íons (HPAEC/PAD), acoplada a um detector de amperometria pulsada, obtidos a partir da hidrólise ácida dos EPS.

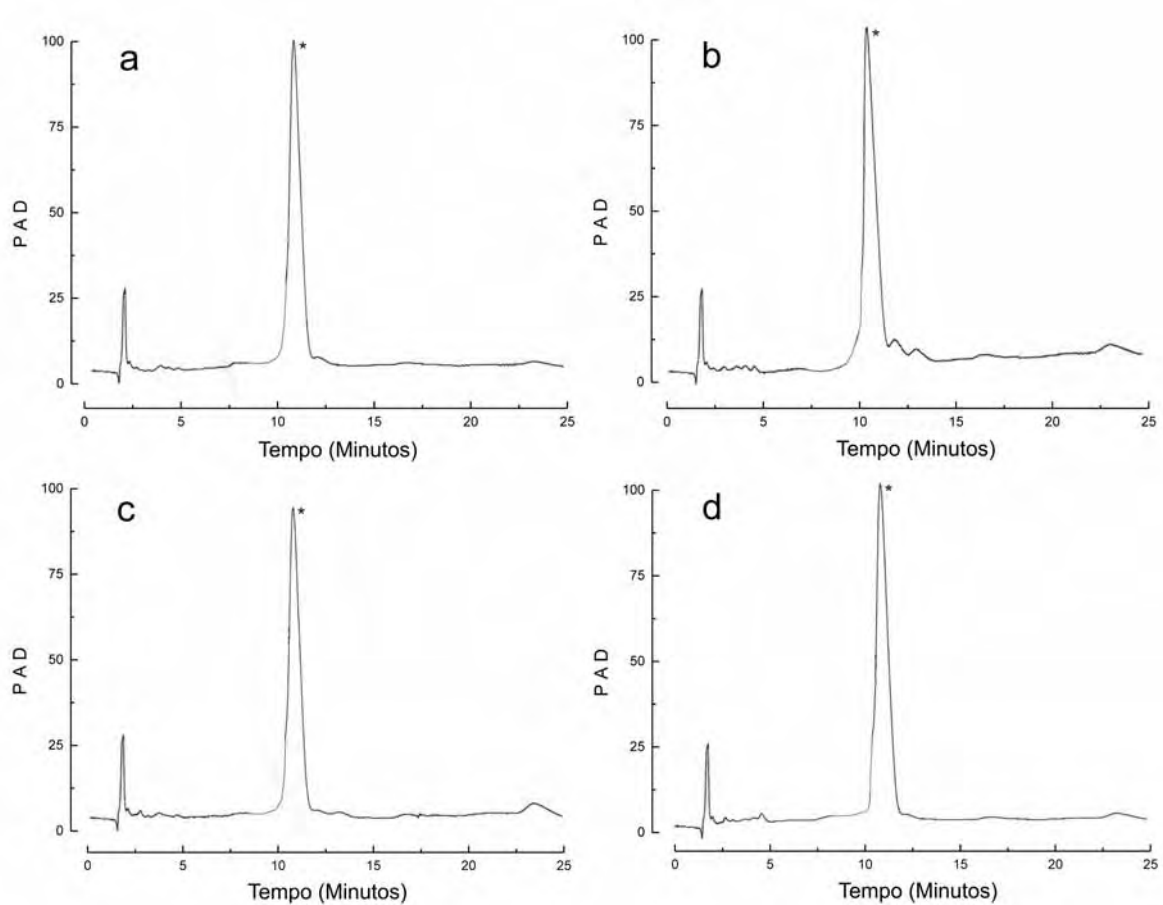


Figura 6: Análise dos hidrolisados de EPS produzidos pelos diferentes isolados por HPAEC/PAD. Condições da corrida: isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condições de hidrólise: TFA 5M, 16 horas, 100 °C. Quantidade de material: 50 µg. **a:** EPS<sub>GRAVIOLA</sub>; **b:** EPS<sub>MANGA</sub>; **c:** EPS<sub>PINHA</sub>; **d:** EPS<sub>LARANJA</sub>. \*Tempo de Retenção de glucose ( $T_R$ ): 10,94 minutos

O hidrolisado de cada um dos EPS, quando aplicado no cromatógrafo de íons, eluiu como um único pico com um tempo de retenção de 10,94 minutos que corresponde ao tempo de retenção do padrão de glucose, presente numa mistura de padrões (Figura 7) analisada nas mesmas condições da corrida cromatográfica das amostras.

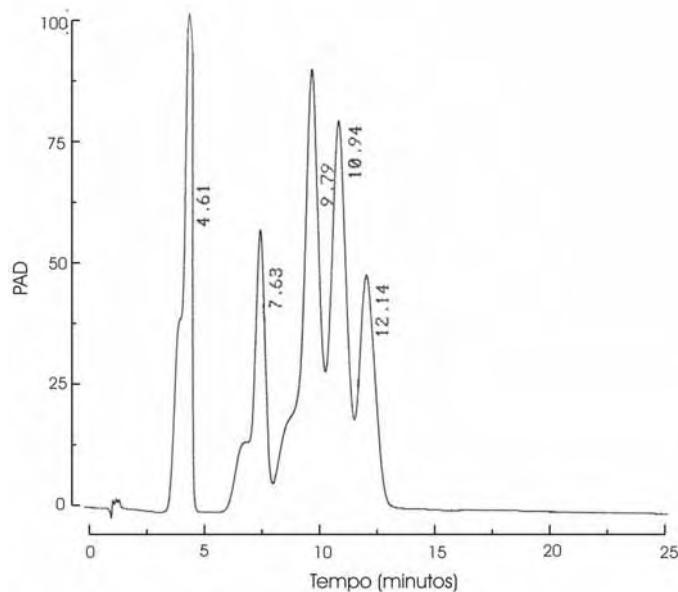


Figura 7: Análise por HPAEC/PAD. da mistura de padrões de açúcares neutros. Condições da corrida: isocrática (NaOH 14mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Quantidade de material aplicado: 200ng de cada açúcar. Tempos de Retenção (em minutos): fucose (4,61); raminose (7,63); galactose (9,79); glucose (10,94); manose (12,14).

A partir desses resultados é possível afirmar que os EPS são homopolímeros de glucose, ou seja, glucanas. A produção de glucana extracelular parece ser uma característica do gênero *Botryosphaeria* (SELBMANN et al, 2002; BARBOSA et al., 2004; CROGNALE et al., 2007). Além de secretar esses polímeros para o ambiente, esses fungos podem também apresentar glucanas semelhantes como constituintes principais da parede celular, como determinado por Corradi da Silva e colaboradores (2008).

Análises por metilação têm sido importantes para caracterização estrutural de polissacarídeos. Ela envolve a metilação completa do polímero, seguida de hidrólise para obtenção de monossacarídeos parcialmente metilados, reduzidos a alditóis e acetilados para serem transformados em compostos voláteis que possam ser analisados por cromatografia gasosa. Os tipos de ligações glicosídicas podem ser deduzidos a partir das posições dos grupamentos metila presentes nos acetatos de alditóis parcialmente metilados; entretanto a metilação não fornece informações sobre a conformação anomérica das ligações (PAZUR, 1994).

Neste trabalho, a eficiência da reação de metilação dos exopolissacarídeos foi efetuada pela comparação dos espectros de FTIR do material não metilado e do produto metilado. Há necessidade que todos os hidrogênios presentes nas hidroxilas livres do polissacarídeo sejam substituídos por grupamentos metila. Geralmente a alternância de procedimentos gera moléculas totalmente metiladas. Neste trabalho procedimentos de Haworth (1915) e de Ciucanu, Kerek (1984), foram necessários para obter 100% de eficiência na metilação. Essa afirmativa pode ser verificada a partir da figura 8.

Os espectros de FTIR dos quatro exopolissacarídeos produzidos pelos isolados do *Botryosphaeria* são característicos de moléculas de açúcar, com intensa banda de absorção na região de  $3369\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento do grupamento OH (LIU et al., 2007). O mesmo sinal não foi observado no material metilado, pois à medida que a reação se processa, a intensidade da banda de absorção diminui, estando ausente no polissacarídeo completamente metilado. Bandas em  $2922\text{ cm}^{-1}$  (CAO et al., 2006) e  $1463\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas, respectivamente, ao estiramento de CH em grupos metil e a deformação da ligação C-H assimétrica, estão presentes em maior intensidade nos materiais metilados, mostrando que a reação de metilação foi eficiente para a substituição dos grupos OH por grupos metila nos EPS<sub>LARANJA</sub>, EPS<sub>MANGA</sub> e EPS<sub>GRAVIOLA</sub>, e parcialmente efetiva no EPS<sub>PINHA</sub>.

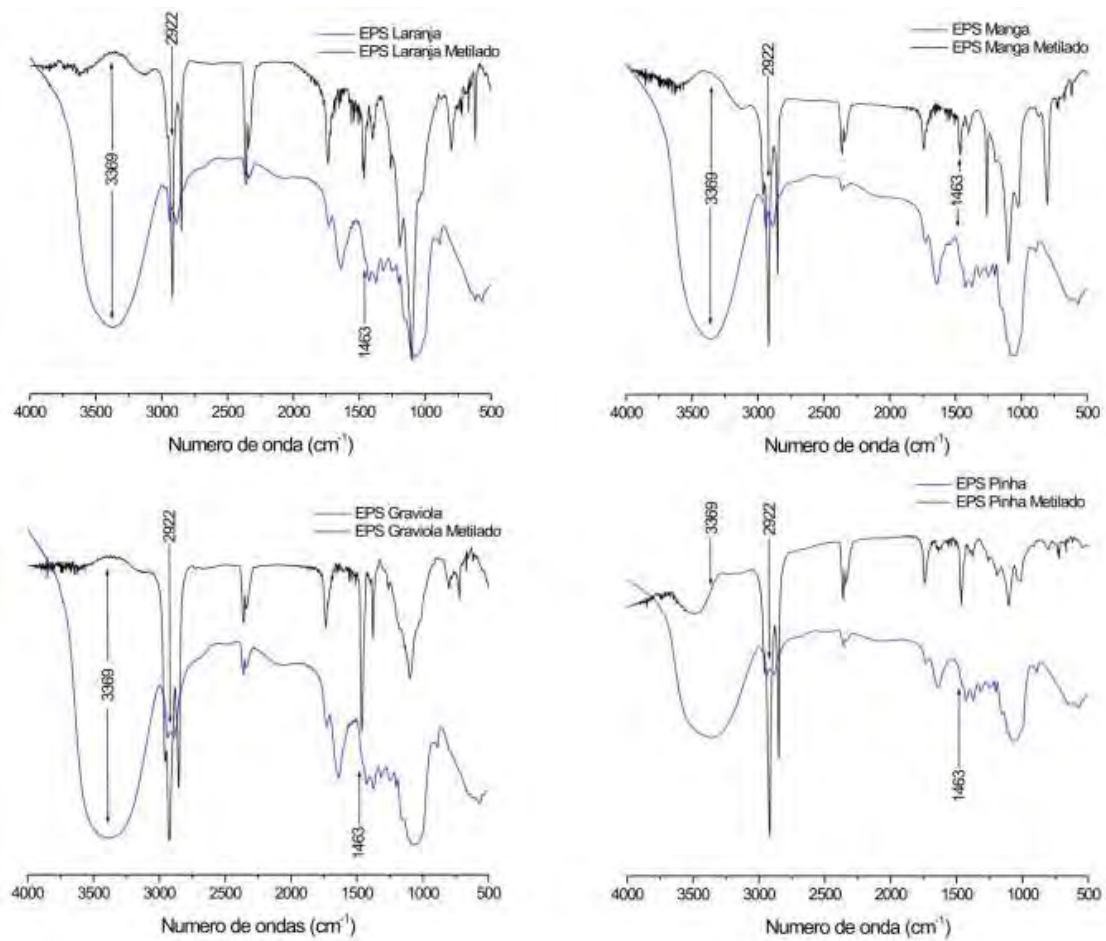


Figura 8: Espectros de infravermelho acoplados ao transformador Fourier (região de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ ) dos EPS antes e após a metilação.

Após confirmação da eficiência da metilação, pelas análises de FTIR, os exopolissacarídeos completamente metilados foram, então, hidrolisados a monossacarídeos parcialmente metilados, reduzidos a acetatos de alditóis parcialmente metilados e então acetilados. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por cromatografia gasosa e derivados obtidos para cada um dos polissacarídeos estão mostrados na tabela 4.



Tabela 4: Resultados da análise por cromatografia gasosa dos acetatos de alditóis parcialmente metilados formados na análise de metilação dos EPS produzidos pelos isolados de *Botryosphaeria* obtidos de graviola, manga, pinha e laranja

EPS	Componentes <sup>a</sup>	T <sub>R</sub> <sup>b</sup>	Porcentagem Molar (%)	Ligação
EPS <sub>GRAVIOLA</sub>	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	23	Glc <sub>p</sub> -(1→
	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.82	56	→3)-Glc <sub>p</sub> -(1→
	2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	4.20	21	→3,6)-Glc <sub>p</sub> -(1→
EPS <sub>MANGA</sub>	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	0.6	Glc <sub>p</sub> -(1→
	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	2.20	99.4	→6)-Glc <sub>p</sub> -(1→
EPS <sub>PINHA</sub>	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	0.7	Glc <sub>p</sub> -(1→
	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	2.20	99.3	→6)-Glc <sub>p</sub> -(1→
EPS <sub>LARANJA</sub>	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	0.5	Glc <sub>p</sub> -(1→
	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	2.20	99.5	→6)-Glc <sub>p</sub> -(1→

<sup>a</sup> 2,3,4,6-tetra-*O*-Me-Glc = 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-glucose, etc.

<sup>b</sup> Tempo de retenção dos acetatos de alditóis comparados a 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-glucose.

A análise de metilação para o EPS<sub>GRAVIOLA</sub> (Tabela 4) exibiu como principais derivados 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-glucose, 2,4,6-tri-*O*-metil-glucose e 2,4-di-*O*-metil-glucose na porcentagem molar de 23:56:21, respectivamente, o que determina que este EPS é uma glucana com cadeia principal de unidades glucopiranosídicas (1→3) ligadas, com 20% de substituições em C-6 por resíduos glucopiranosídicos, o que está de acordo com os dados obtidos na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C (Figura 10 a). Valores semelhantes foram

encontrados para glucanas produzidos por *Pleurotus eringii* (GUTIERREZ, PRIETO, MARTÍNEZ, 1996) e *Phlebia radiata* (KRCMAR et al., 1999).

Em relação aos EPS<sub>MANGA</sub>, EPS<sub>PINHA</sub> e EPS<sub>LARANJA</sub>, os derivados obtidos, 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucose e 2,4,6-tri-O-metil-glucose, correspondem, respectivamente, às extremidades finais não redutoras de glucopirranose (~1%) e ao O-6 substituído (~99%), mostrando uma estrutura linear para essas moléculas. Estes resultados, em conjunto com os dados obtidos da ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C (Figura 10: b, c, d), demonstram que esses três exopolissacarídeos são (1→6)-glucanas lineares.

O FT-IR é uma técnica espectroscópica utilizada para auxiliar na determinação da configuração da ligação glicosídica, em polissacarídeos. O princípio do método baseia-se na variação dos estados de energia vibracional das moléculas, que são específicos para cada grupo funcional (CAMPBELL; WHITE, 1989; KACURÁCOVÁ et al., 2002; WOLKERS et al., 2004).

Embora o espectro de infravermelho seja característico de toda a molécula, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura molecular. A presença dessas bandas, características de grupos, permite a obtenção, através de exame simples de espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis, e é neste fato que se baseia a identificação de estruturas (ŠANDULA et al., 1999).

Os espectros de FT-IR (Figura 9) obtidos dos EPS produzidos pelos quatro isolados de fungo, mostraram bandas de absorção em 891 cm<sup>-1</sup> e 1371 cm<sup>-1</sup>, que são características de ligação β (SCWEIGER-HUFNAGEL et al., 2000; PENG et al. 2005) e de β-glucanas (GUTIERREZ, PRIETO, MARTÍNEZ, 1996), respectivamente. A ausência de banda em 843 cm<sup>-1</sup> indica que ligações em configuração α não estão presentes nas moléculas. Espectros de FTIR semelhantes foram encontrados para as glucanas produzidas pelos fungos *Epicoccum nigrum* (SCHMID et al., 2001), *Phlebia radiata* (KRCMAR et al., 1999) e *Pleurotus tuber-regium* (ZHANG et al., 2001).

A ausência de absorção em  $1535\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao grupamento amida, sugere que não estão presentes quantidades consideráveis de proteína nas amostras analisadas.

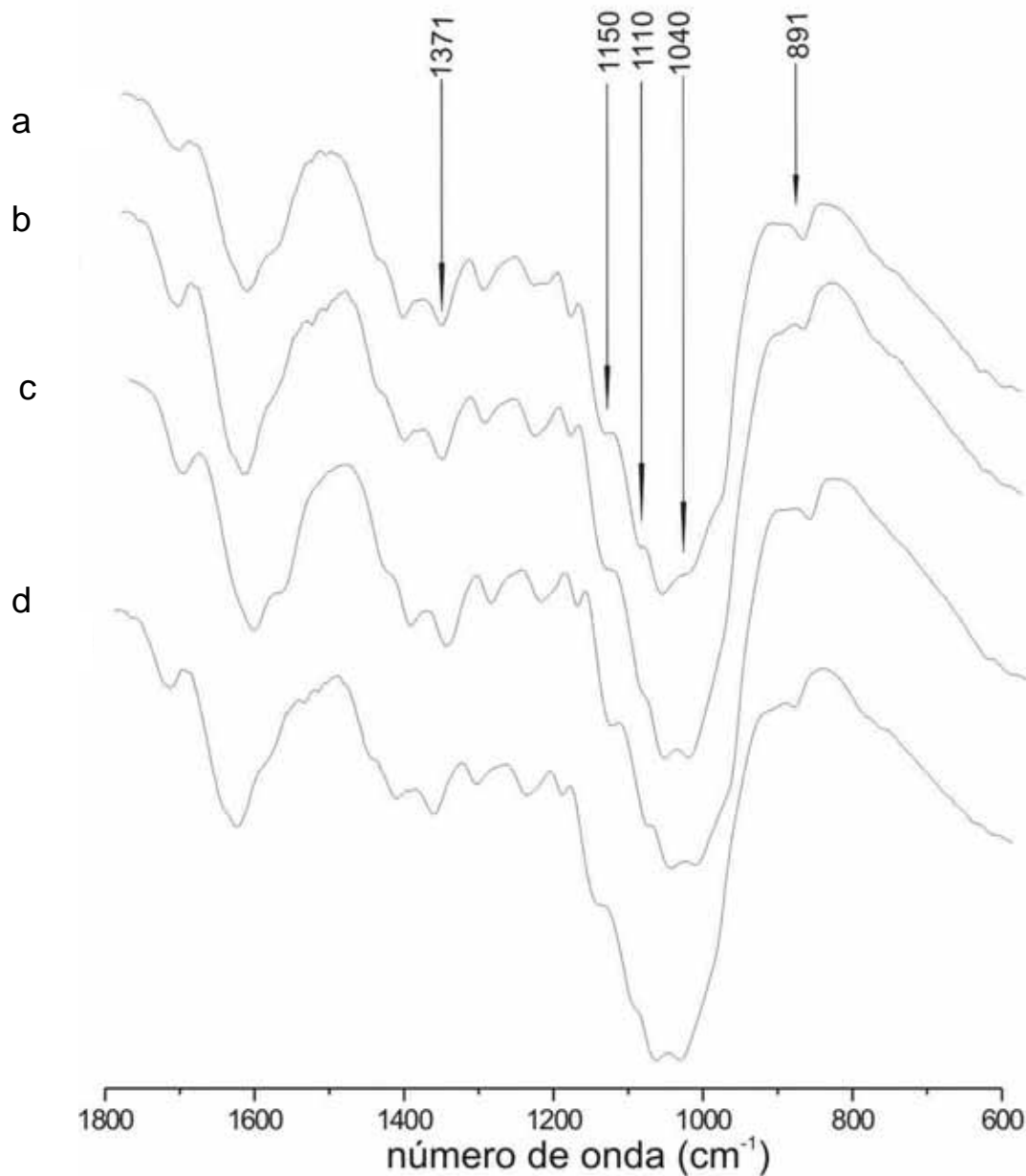


Figura 9: Espectro de infravermelho acoplado ao transformador Fourier (região de  $1800\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$ ) dos EPS produzidos pelos isolados de *Botryosphaeria*. **a**: EPS<sub>GRAVIOLA</sub>; **b**:EPS<sub>MANGA</sub>; **c**:EPS<sub>PINHA</sub>; **d**: EPS<sub>LARANJA</sub>

As bandas em 1150, 1110 e 1040  $\text{cm}^{-1}$  são típicas de polímeros constituídos por unidades glucopiranosídicas (GUTIERREZ, et al., 1996; ZHAO et al., 2005). Estes resultados demonstraram que EPS produzidos pelos isolados de *Botryosphaeria* são  $\beta$ -glucanas.

As análises de RMN- $^{13}\text{C}$  confirmaram os resultados obtidos nas análises de FT-IR. A ressonância magnética nuclear baseia-se na observação de que núcleos magnéticos como  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  podem absorver energia em frequências características. Cada molécula tem um espectro de RMN característico, e uma das grandes vantagens dessa técnica é seu caráter não destrutivo. Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono treze dos EPS produzidos pelos isolados de laranja, manga e pinha (Figura 10: b, c, d) apresentaram sinais de deslocamentos químicos consistentes com aqueles registrados na literatura (SUGAWARA et al., 2004; GONZAGA et al., 2005) para  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$ 6) glucanas.

A ausência de sinal na região de  $\delta$  60.0 ppm indica que todos os carbonos primários (C-6) estão envolvidos na ligação glicosídica, representados pelo sinal intenso na região próxima de  $\delta$  69,0 ppm. Um único sinal na região de carbono anomérico caracteriza a molécula como um polímero linear e o  $\delta$  próximo de 102,9 ppm indica que as unidades glucopiranosídicas estão em configuração  $\beta$ . Os demais deslocamentos químicos nas regiões de 75,9, 75,0, 73,2 e 69,9 ppm foram atribuídos aos carbonos C-3, C-5, C-2 e C-4, respectivamente.

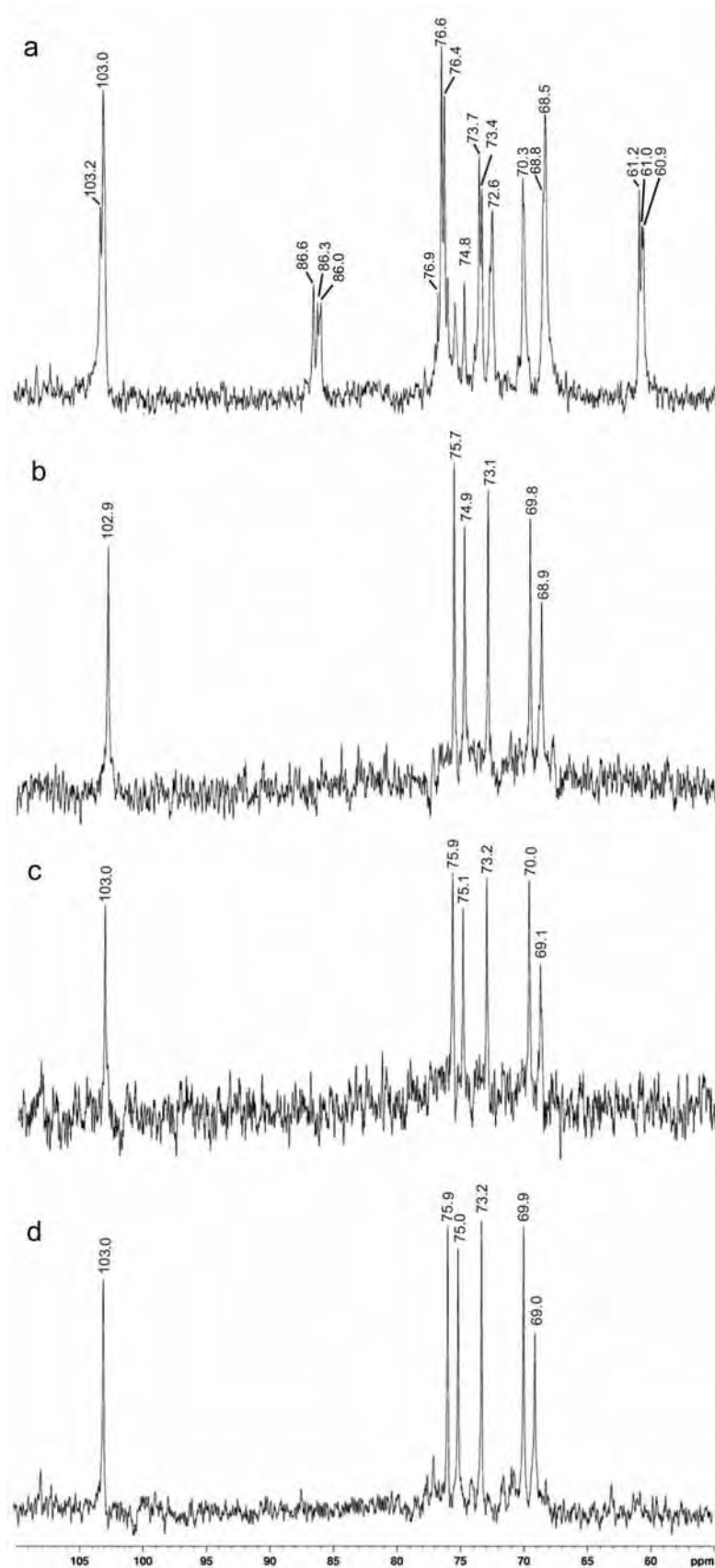


Figura 10: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos EPS produzidos pelos isolados. **a**: EPS<sub>GRAVIOLA</sub>; **b**: EPS<sub>MANGA</sub>; **c**: EPS<sub>PINHA</sub>; **d**: EPS<sub>LARANJA</sub>. Os deslocamentos químicos são expresso em  $\delta$  p.p.m.

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C do EPS produzido pelo isolado de graviola (Figura 10: a) foi semelhante àqueles encontrados na literatura para  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) glucanas com ramificação em C-6, incluindo o botriosferana, EPS produzido pelo *B. rhodina* (CORRADI DA SILVA et al., 2005). O sinal em 103,0 ppm, o mais intenso nessa região, foi atribuído ao C-1 das unidades glucopiranosídicas 3-O-substituídas. Considerando que a regra geral da glicosilação do carbono anomérico do tipo  $\beta$  desloca o sinal de ressonância para campo mais baixo (SCHMID et al., 2001), pode-se inferir que o sinal  $\delta$  103,2 ppm pode ser atribuído ao C-1 das unidades 3-O-substituídas com ramificação em C-6. Os sinais de carbono 3 foram detectados em  $\delta$  86,6,  $\delta$  86,3 e  $\delta$  86,0 ppm; o mais intenso em  $\delta$  86,6 ppm (resíduos A e E, Figura 11) e 86,3 ppm (resíduos B e D, Figura 11) foram atribuídos às substituições em O-3;  $\delta$  86,0 ppm vem das unidades 3,6 di-O-substituídas (resíduo C, Figura 11) e aquele em 76,9 ppm corresponde ao C-3 das unidades terminais não redutoras (resíduo F, Figura 11). Ressonância em 68,8 ppm vem das substituições em O-6 (resíduo C, Figura 11), enquanto aquelas em 61,2 ppm (resíduo A e E, Figura 11), 61,0 ppm (resíduos B e D, Figura 11) e 60,9 ppm (resíduo F, Figura 11) vem de C-6 não substituídos. Toda a atribuição foi efetuada por comparação aos espectros de polissacarídeos semelhantes, encontrados na literatura (GUTIÉRREZ et al., 1996; CORRADI DA SILVA et al., 2005).

Através do conjunto de dados espectroscópicos obtidos por análises de FT-IR e RMN-<sup>13</sup>C é possível caracterizar os EPS produzidos pelos isolados de manga, pinha e laranja como glucanas lineares unidas por ligações do tipo  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) e o EPS produzido pelo isolado de graviola como uma glucana com ligações  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) e com ramificações em C-6 de resíduos glucopiranosídicos.

As estruturas propostas para as  $\beta$ -D-glucanas estão esquematizadas na figura 11.

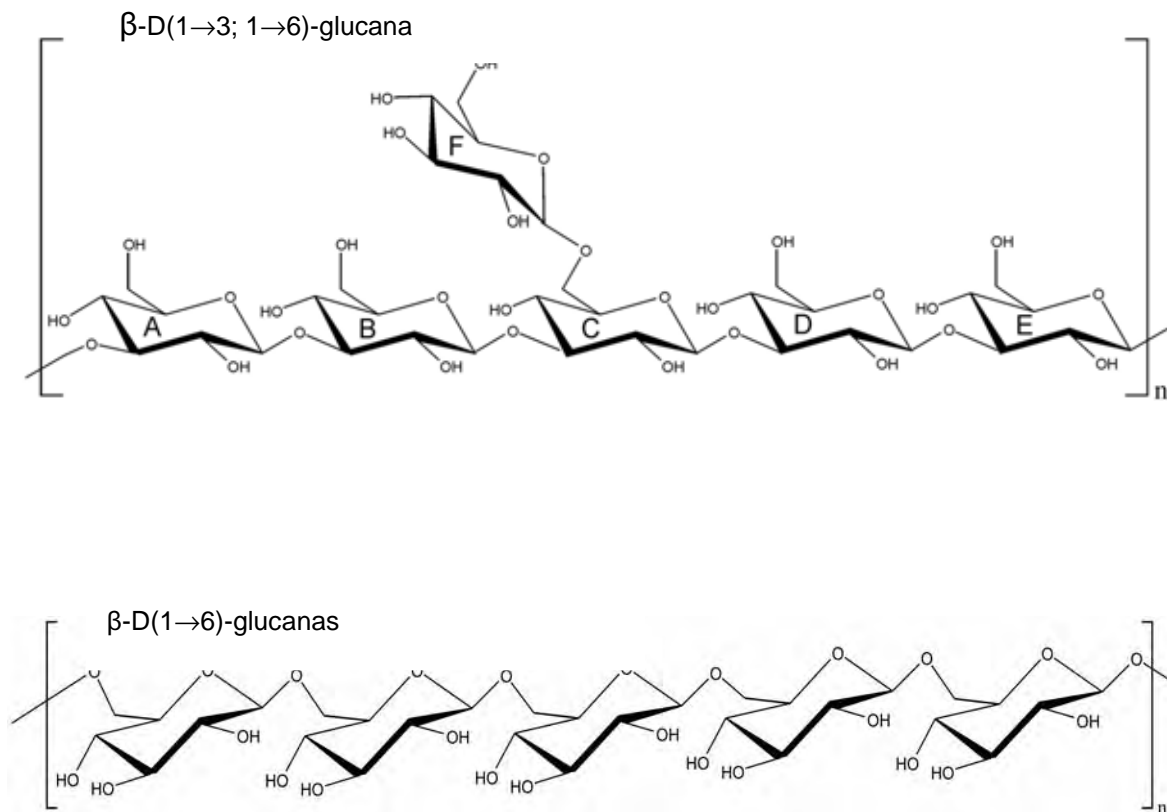


Figura 11: Estruturas prováveis da  $\beta$ -D(1→3; 1→6)-glucana e das da  $\beta$ -D(1→6)-glucanas

Sasaki e colaboradores (2002) isolaram e identificaram uma glucana extracelular  $\beta$ -(1→6), do fungo entomopatogênico *Guignardia citricarpa* crescido em meio nutriente contendo glucose, com estrutura semelhante à pustulana. Entretanto, quando a glucose foi substituída por sacarose, ocorreu a produção de uma  $\beta$ -galactana extracelular em forma furanosídica. Neste trabalho, a presença de sacarose pode ter favorecido a produção dessas glucanas pelos três isolados.

Exopolissacarídeos fúngicos do tipo  $\beta$ -D-(1→6)-glucana são incomuns, até mesmo raros, e de acordo com a literatura, essas glucanas tem um

papel chave na formação da parede celular, pois facilita a interação entre os constituintes da parede, através de ligações cruzadas (KÓLLAR et al., 1995; SHAHINIAN, BUSSEY, 2000).

Sugawara e colaboradores (2004) isolaram da parede celular do *Schizosaccharomyces pombe* um polissacarídeo caracterizado por ressonância magnética nuclear de carbono treze, como uma  $\beta$ -(1→6)-D-glucana substituída em C-3 por resíduos glucopiranosídicos,. Corradi e colaboradores (2008) extraíram da parede celular do *B. rhodina* MAMB-05, uma fração contendo uma  $\beta$ -(1→6)-D-glucana linear.

A produção de  $\beta$ -(1→6)-D-glucanas extracelulares pelos isolados de manga, pinha e laranja não está bem esclarecida. É possível que esses polímeros possam surgir durante processos de síntese e remodelagem ocorridos durante o crescimento celular, sendo excretados para o ambiente, auxiliando, por exemplo, na infecção da planta hospedeira, considerando que os microrganismos produtores são fitopatogênicos. O fato mais importante é que a secreção dessas glucanas, até então obtidas por extração da biomassa, é uma novidade que pode ser explorada biotecnologicamente. De acordo com estudos realizados por Rubin-Bejerano e colaboradores (2007),  $\beta$ -(1→6)-D-glucanas podem ser imunoestimuladoras mais potentes de células do sistema imune, como neutrófilos, do que  $\beta$ -(1→3)-D-glucanas, já consagradas com este tipo de atividade biológica. Ainda, segundo esses autores, foi observado que  $\beta$ -(1→6)-D-glucana estimulou tanto células fagocitárias quanto substâncias que reagem com oxigênio, mostrando também uma possível atividade antioxidante para essas moléculas. Portanto, as exoglucanas  $\beta$ -(1→6) produzidas pelos três isolados de *B. rhodina* podem ser interessantes para aplicação em testes de imunomodulação ou atividade antioxidante.



#### 5.4. Análise conformacional dos exopolissacarídeos produzidos pelos diferentes isolados de botriosferáceos

A estrutura em tripla hélice existente nos EPS é responsável pela viscosidade dos polissacarídeos em solução (DONG, JIA, FANG, 2006) e, segundo relatos da literatura, também uma condição fundamental para a atividade biológica (MUELLER et al., 2000; FALCH et al., 2000; LEUNG et al., 2006), principalmente pela manutenção das ligações de hidrogênio existentes inter e intra molecularmente. A conformação em tripla hélice pode ser modificada, acarretando a desnaturação do polímero, através do aumento da alcalinidade do meio, de temperaturas elevadas ou através do uso de um solvente aprótico como o DMSO. A desnaturação, em qualquer uma das situações descritas leva ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio (FALCH et al., 2000).

As glucanas quando em solução podem apresentar estrutura em tripla hélice, hélice simples ou conformação randômica (ou acaso), sendo a tripla hélice sugerida como a conformação mais bioativa (YOUNG, JACOBS, 1998).

Segundo Ogawa e colaboradores (1972), concentrações de NaOH entre 0,01 e 0,19M promovem uma perda gradual da rigidez da estrutura do polissacarídeo, reduzindo a viscosidade, o que facilita a complexação com o corante Vermelho Congo. Em concentrações entre 0,19 a 0,24M ocorre a quebra das pontes de hidrogênio, dando início a transição da conformação helicoidal para a randômica, perdendo assim a capacidade de formar complexos com o corante. Em concentrações acima de 0,24M existe predominância de conformações ao acaso.

A relação entre a formação do complexo CR/EPS e a conformação pode ser acompanhada pela mudança do comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{MAX}$ ), em cada uma das concentrações de NaOH (Figura 12). Todos os EPS estudados tiveram deslocamento de  $\lambda_{MAX}$ , mostrando que possuem estruturas com conformações bem ordenadas, principalmente em tripla hélice. Entretanto, a presença desse tipo de hélice provavelmente é diferente em cada EPS, apesar de estrutura semelhante, como para os EPS<sub>MANGA</sub>, EPS<sub>PINHA</sub> e EPS<sub>LARANJA</sub>, todos  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucanas lineares.

O EPS<sub>LARANJA</sub> foi o que apresentou um maior deslocamento de  $\lambda_{MAX}$ , (501 nm na concentração de 0,2 M de NaOH), sugerindo maior predominância de hélice tripla quando comparado aos demais exopolissacarídeos com estrutura semelhante. O EPS<sub>GRAVIOLA</sub>, caracterizado como uma  $\beta$ -D(1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6)-glucana, também apresentou deslocamento, mas menor do que o EPS<sub>LARANJA</sub>. Nenhuma mudança foi observada para dextrana, uma  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana que não existe em conformação de hélice e é utilizada como referência.

Muitas  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)-D-glucanas possuem conformação em tripla hélice quando em solução e, essa condição, é importante para que essas moléculas possam ser utilizadas como substâncias modificadoras da resposta imunológica (BRM) (LEUNG et al., 2007). As  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)-D-glucanas também são interessantes para esta aplicação.

Uma variedade de *B. rhodina* DABAC P82 produtora de  $\beta$ -glucana, foi investigada por Moresi e colaboradores (2003). Nos experimentos efetuados com o complexo Vermelho Congo-EPS foi confirmada a presença de tripla hélice pela formação do complexo entre 0,05 – 0,20M de NaOH. A grifolana, uma  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana produzida pelo fungo *Grifola frondosa* apresentou tripla hélice, quando se avaliou a relação do complexo Congo Red/ EPS (MAO; HSU; HWANG, 2007). Outros autores também confirmaram a presença de tripla hélice em  $\beta$ -D-glucanas pela formação do complexo com o corante Congo Red (RAMESH; THARANATHAN, 1998; CHENGHUA et al., 2000; DONG; JIA; FANG, 2006; ROUT et al., 2008).

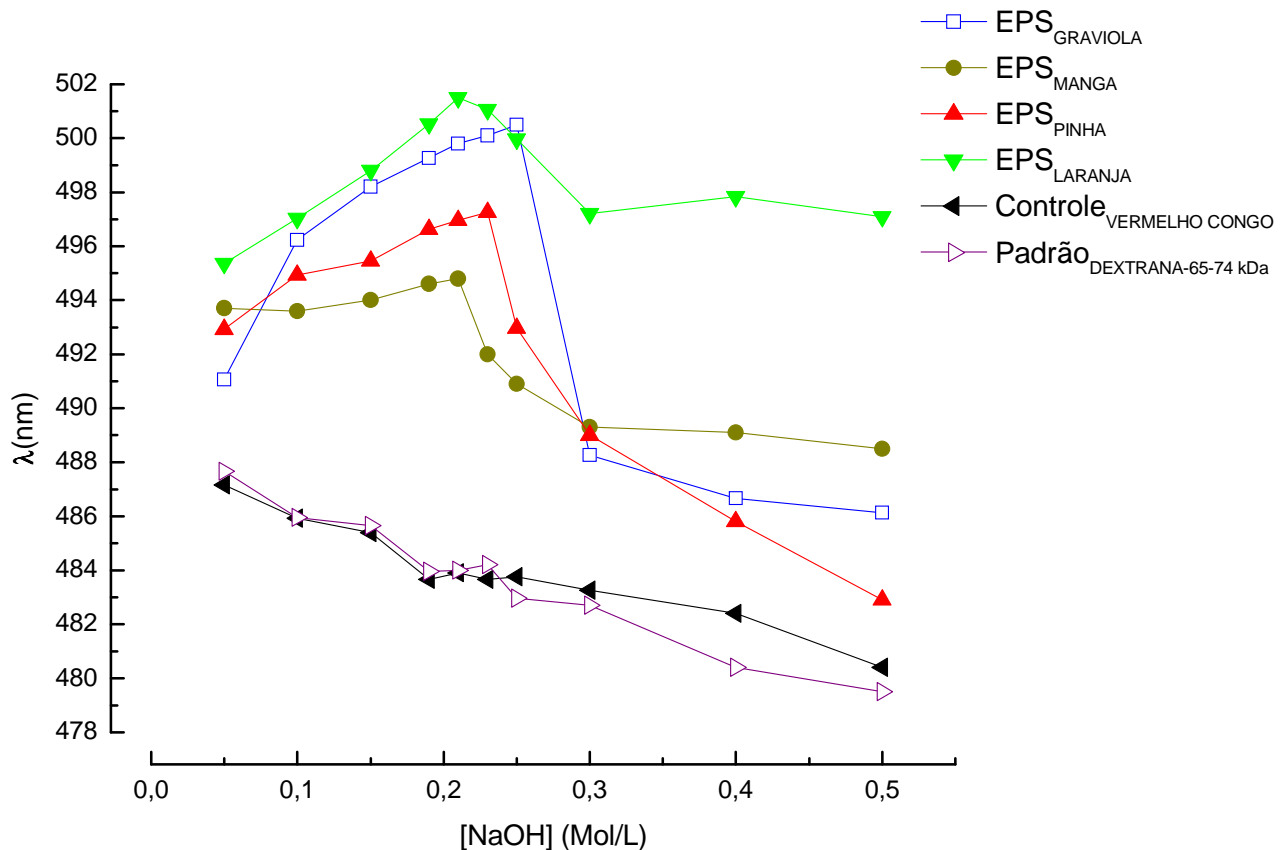


Figura 12: Análise conformacional dos EPS produzidos pelos isolados de *Botryosphaeria* de acordo com a mudança de absorção máxima do complexo Vermelho Congo-EPS, em várias concentrações de NaOH. Vermelho Congo e dextrana foram utilizados como controles

Bongiovani (2008) utilizando o Vermelho Congo para analisar a conformação das  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6) glucanas, denominadas botriosferanas, produzidas pelo *B. rhodina* MAMB-05, em glucose, sacarose e frutose como fontes de carbono, observou que a quantidade de tripla hélice depende do grau de ramificação das moléculas. Os botriosferanas produzidos em sacarose e glucose, com graus de ramificação de 21 e 22% respectivamente, apresentavam um maior deslocamento do  $\lambda$  nas concentrações entre 0,1 e 0,19M de NaOH, demonstrando maior quantidade de tripla hélice. Para a mesma faixa de concentração de NaOH, o

EPS em frutose, com maior grau de ramificação (31%), formou um composto de cor menos intensa indicando que, provavelmente, a presença das ramificações impede a formação da hélice tripla e, conseqüentemente, a inclusão do corante, que dá origem ao complexo CR/EPS.

O EPS<sub>GRAVIOLA</sub>, com cerca de 20% de ramificação em C-6 por resíduos  $\beta$ -D-glucopiranosídicos, mostrou um deslocamento de  $\lambda$  de máximo absorção muito semelhante ao botriosferana (500,5 nm em 0,21 M de NaOH) e a cor do complexo CR/EPS foi semelhante aquelas apresentadas pelos demais exopolissacarídeos produzidos pelos isolados de *Botryosphaeria*.

### **5.5. Sulfatação e atividade anticoagulante do EPS<sub>LARANJA</sub>, uma $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana**

A inserção de grupamentos químicos em glucanas, tal como sulfato, gera moléculas mais solúveis em água e os grupamentos inseridos podem favorecer diferentes atividades biológicas como antitrombótica, antiviral ou anticoagulante (MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005 A, B). Muitas vezes, a derivatização química também pode potencializar a atividade biológica em relação à molécula original (ZHANG et al., 2000; KIHIO et al., 1994), pois a bioatividade apresentada pelas macromoléculas, quando em solução, depende, entre outras características, da estrutura química da mesma.

O fungo comestível, *Pleurotus tuber-regium*, produz um polissacarídeo solúvel em água que apresenta ação antitumoral. Tal polímero foi sulfatado e a atividade antitumoral contra uma linhagem de células de câncer hepático humano foi testada. A atividade antitumoral do polissacarídeo sulfatado foi comparativamente maior do que aquela apresentada pelo polissacarídeo natural, o que se deve provavelmente ao aumento da solubilidade proporcionada pela modificação química e, também, à presença de grupos sulfato (TAO, ZHANG, CHEUNG, 2006).

A pululana, produzida pela levedura *Aureobasidium pullulans* é uma das poucas glucanas fúngicas aplicadas comercialmente. Alban e colaboradores (2002) sulfataram a molécula e realizaram testes de atividade anticoagulante e observaram que a pululana sulfatada apresentou atividade muito similar à da heparina, com seu efeito sobre a cascata de coagulação sanguínea dependente da massa molecular, grau de substituição e distribuição dos grupamentos sulfato em diferentes posições dos resíduos de glucose

Neste trabalho, o EPS<sub>LARANJA</sub>, caracterizado como uma  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana, foi selecionado para o processo de sulfatação entre os quatro EPS produzidos, devido algumas características especiais apresentadas pelo polímero no decorrer dos experimentos: melhor rendimento,  $\beta$ -glucana mais pura e homogênea e predominância de tripla hélice. A sulfatação desse material pode aumentar sua solubilidade e favorecer a atividade biológica anticoagulante. A partir desse momento, o EPS<sub>LARANJA</sub> será sempre citado com o nome de sua estrutura, que é uma  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana e a molécula derivatizada pela adição de grupos sulfatos será denominada de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada.

Foram realizados três ciclos de sulfatação com a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana, utilizando a formamida como solvente, piridina como catalisador da reação e ácido clorosulfônico como doador de grupos sulfatos. A piridina por ser uma base orgânica forte, pode atacar o polissacarídeo nucleofílicamente, enfraquecendo a ligação H-O e facilitando a entrada do agente sulfatante.

Todo o procedimento da reação de sulfatação foi acompanhado por espectrometria de UV-Vis (Figura 13) e espectroscopia de FT-IR (Figura 14).

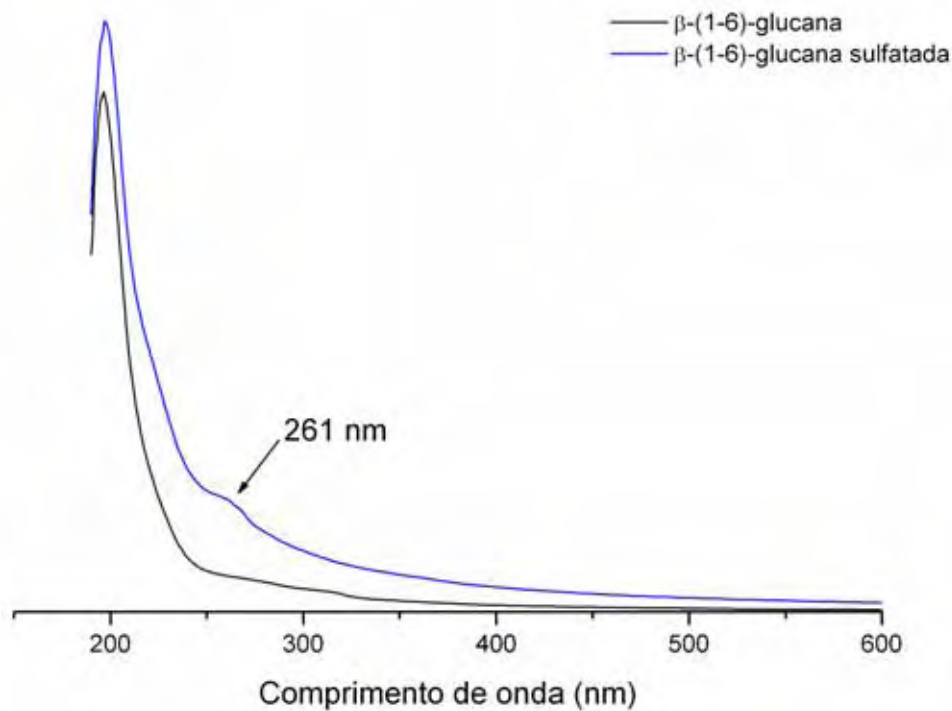


Figura 13: Espectroscopia de Absorção UV/Vis referentes a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana e  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada. Faixa de absorção: 190 a 600 nm. Concentração Das soluções de EPS: 1mg/mL.

Os espectros de absorção UV-VIS da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana antes e após as reações de sulfatação, mostram uma banda de absorção na região de 261 nm, que pode ser atribuída à transição  $n\rightarrow\pi^*$  do grupo sulfato e que também está relacionada às insaturações formadas durante o processo de sulfatação (YANG et al., 2003). Esse resultado indica que a reação de derivatização ocorreu com sucesso, pois somente a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada apresenta esta banda.

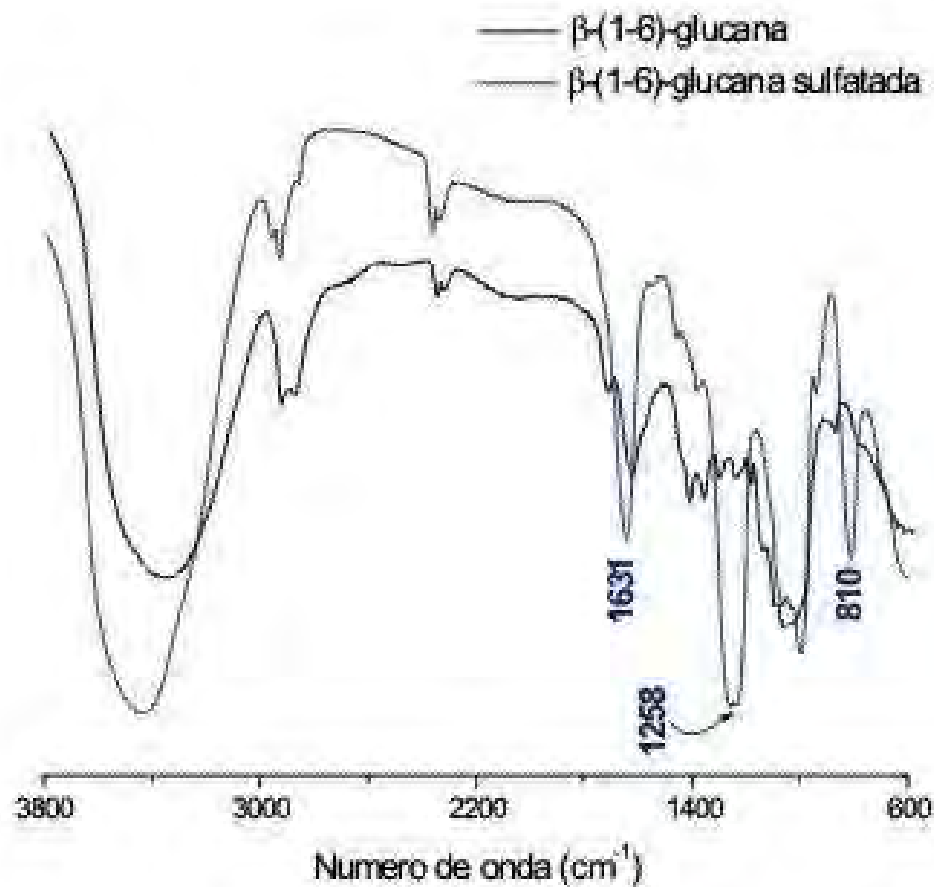


Figura 14: Espectros de FT-IR (região de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>) da β-D-(1→6)-glucana, antes e após sulfatação.

A inserção de grupos sulfato na amostra faz surgir novas bandas no espectro de FT-IR (Figura 14) visualizadas pelas absorções nas regiões de 1258 cm<sup>-1</sup>, atribuídas ao estiramento assimétrico da ligação S=O presente no grupamento SO<sub>3</sub> (ZHANG et al., 2000; YANG et al., 2002; TAMADA, 2004), e também uma banda na região de 810 cm<sup>-1</sup>, atribuída a vibração simétrica da ligação C-O-S do grupo COSO<sub>3</sub>, indicando que a reação de sulfatação foi eficaz (ZHANG et al., 2000; YANG et al., 2002; NIE et al., 2006). Outro sinal que se intensifica é o de 1631 cm<sup>-1</sup>, atribuído às insaturações formadas no processo de sulfatação (YANG et al., 2003).

O conteúdo de enxofre (S%) da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada foi determinado pelo cálculo do grau de substituição (DS). Os valores obtidos neste tipo de análise indicam o número médio de resíduos de sulfato presentes nos monossacarídeos componentes da cadeia polissacarídica (YANG et al., 2002; YANG et al., 2005). Esta análise é importante, pois a bioatividade dos polissacarídeos sulfatados é fortemente dependente do grau de sulfatação (HUANG, HU et al., 2008), ou seja, geralmente a atividade biológica aumenta com o aumento do grau de sulfatação. Normalmente valores iguais ou maiores que 0,8 são necessários para a atividade anticoagulante (HAN et al., 2005). O conteúdo de enxofre e o D.S. obtido para a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada foram 11,73% e 0,95, respectivamente.

Em estudos de atividade anticoagulante, glucanas quimicamente sulfatadas mostraram D.S. em torno de 1,95 (MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005 A) e 1,74 (NIE et al., 2006). Apesar dos resultados da sulfatação da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana apresentarem valores um pouco inferiores aos encontrados na literatura, são significativos, pois estão dentro da faixa necessária para atividade anticoagulante. Além disso, é um dado inédito a produção e sulfatação de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana.

As posições dos grupos sulfato nos polissacarídeos são normalmente determinadas pela espectroscopia de ressonância magnética de carbono 13 (HAN et al., 2005; WANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008) ou por análise de metilação. Entretanto, neste último caso, os grupos sulfatos podem ser desligados da molécula quando as condições de metilação ocorrerem em meio alcalino como, por exemplo, na metilação de Haworth (HAN et al., 2005). Assim, neste trabalho, para determinar o local da substituição pelos grupos sulfato, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze foi utilizada. Os espectros de ressonância da glucana nativa,  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana, e da glucana sulfatada são mostrados abaixo (Figura 15).



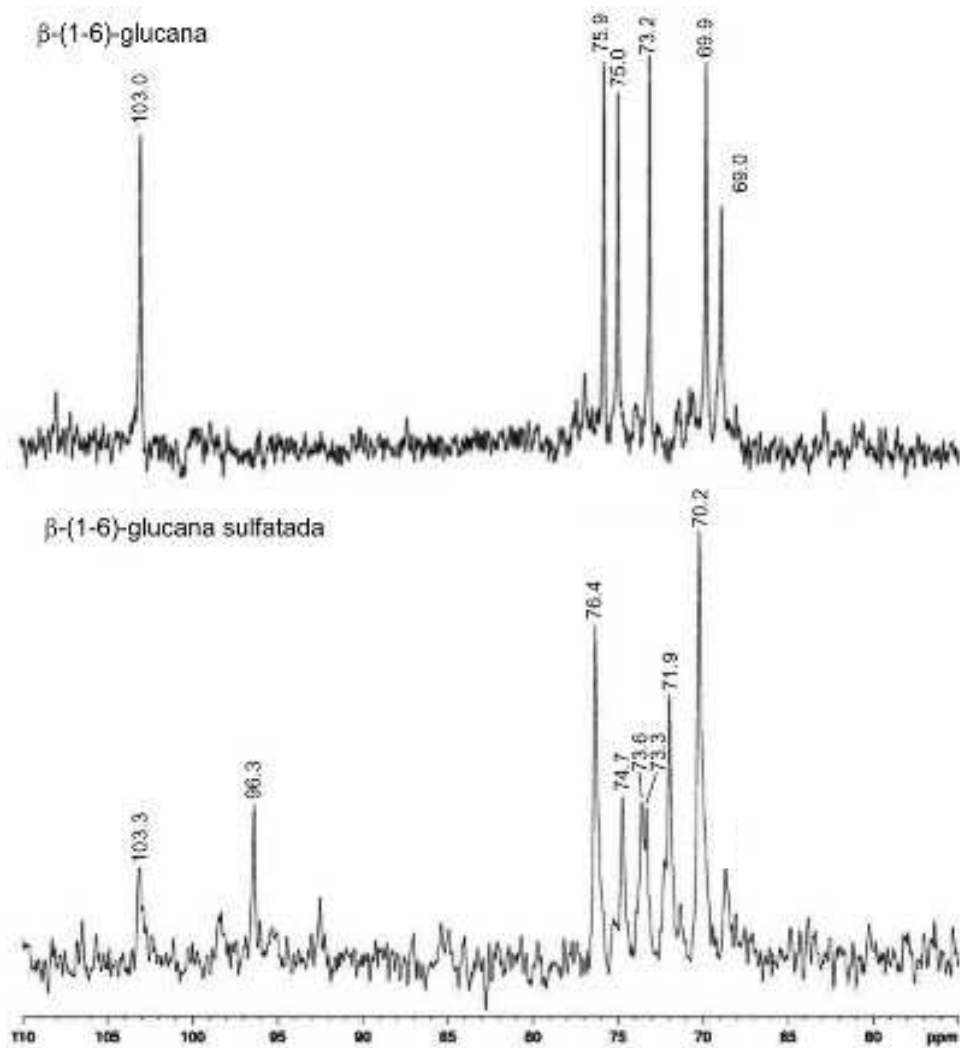


Figura 15: Espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  para a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana e  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada

De acordo com registros da literatura a posição preferencial para a entrada de grupos sulfato em glucanas (1 $\rightarrow$ 3) é a hidroxila do carbono primário, ou seja, do C-6, seguidos dos carbonos 2 e 4 (ZHANG et al., 2000) que, no caso de polímeros constituídos por resíduos de glucose, tem ambas as hidroxilas em posição equatorial. Resultados de análises de metilação para pululana sulfatada, uma  $\alpha$ -D-

(1→4,1→6) glucana, mostraram que a facilidade de entrada dos grupos sulfatos ocorria na ordem C-6>C-2>C-3>C-4, independentemente do procedimento de derivatização e do D.S. (ALBAN, SCHAUERTE, FRANZ, 2002).

Os espectros de RMN-<sup>13</sup>C da glucana nativa e de seu derivado sulfatado são apresentados na figura 15. O sinal de ressonância em 103,0 ppm foi atribuído ao carbono anomérico dos resíduos glucosídicos e em 69,0 ppm ao C-6 substituído. Os demais deslocamentos químicos em 75,9, 75,0, 73,2 e 69,9 ppm foram atribuídos aos carbonos C-3, C-5, C-2 e C-4, respectivamente. Como já demonstrado trata-se de uma β-D-(1→6) glucana linear. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C da β-D-(1→6) glucana sulfatada apresentou uma maior densidade de sinais como consequência da sulfatação de alguns grupos hidroxilas. É possível observar que todos os sinais de ressonância apresentados pela glucana sulfatada sofreram uma pequena variação para campo mais baixo (~ 0,3 ppm), em relação ao polímero original. O novo sinal em 96,3 ppm foi atribuído aos carbonos anoméricos (C-1) sulfatados em C-4 ou em C-2. O sinal intenso em 70,2 ppm corresponde a soma dos C-6 substituídos e dos C-4 livres. O novo sinal em 71,9 ppm corresponde a parte dos C-4 que foram sulfatados. O mesmo pode ser observado em relação aos deslocamentos químicos muito próximos em 73,6 ppm e 73,3 ppm correspondendo aos C-2 sulfatado e livre, respectivamente. As substituições dos hidrogênios das hidroxilas dos carbonos 2 e 4 por grupamentos sulfatos (SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) deve-se, provavelmente, à posição equatorial dessas hidroxilas em relação ao anel piranosídico da glucose. A partir dos resultados encontrados na sulfatação estima-se que há aproximadamente um grupo sulfato (DS: 0,95) por resíduo de glucose do EPS<sub>LARANJA</sub> ocupando as posições 2 ou 4, principalmente.

Após os procedimentos de sulfatação, as soluções de β-D-(1→6)-glucana sulfatada mostraram-se menos viscosas, solúveis, mostrando que a molécula estava pronta para ser ensaiada em relação a atividade anticoagulante, através de testes clássicos de coagulação sanguínea, APTT (Tromboplastina Parcial Ativada), PT (Tempo de Pro-trombina) e TT (tempo de trombina), utilizando a heparina como padrão de referência.

Os vários testes de atividade anticoagulante respondem aos anticoagulantes, ou seja, o prolongamento do tempo de coagulação sanguínea determinado pelos testes mostra a ação anticoagulante e a dose necessária para a eficácia dessa ação.

Estes testes estão relacionados com a cascata de coagulação sanguínea, um processo bioquímico extremamente complexo, onde ocorrem reações enzimáticas sequenciais (por isso cascata), sendo que o objetivo final é a formação do coágulo de fibrina a partir do fibrinogênio. As substâncias envolvidas nessas reações são denominadas de fatores de coagulação.

Em cada um dos estágios da coagulação uma proteína precursora (ou zimogênio) é convertida em uma protease ativa, que cliva uma ou mais ligações peptídicas na molécula precursora. Os componentes que podem estar envolvidos em cada estágio incluem uma protease do estágio precedente, um co-fator protéico não enzimático e uma superfície organizada fornecida pelas plaquetas. A protease final gerada é a trombina (fator IIa), que converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina, constituindo assim o coágulo (WILLIAMS, 1976; MAJERUS et al., 1996). A regulação da cascata de coagulação é realizada por diferentes proteínas, sendo a principal delas a antitrombina, uma proteína plasmática que inativa um grande número de proteinases, inicialmente o fator Xa e a trombina (DESAI, 2004).

O complexo mecanismo da coagulação, ativado quando um vaso sanguíneo sofre lesão, dividi-se em dois modos de atuação: a via intrínseca, iniciada por substâncias estranhas presentes no plasma e a via extrínseca, desencadeada pelo fator tecidual ou tissular, presente em células que normalmente não entram em contato com o plasma (MARTINICHEN, 2001; WANG et al., 2007).

As substâncias chamadas de anticoagulantes atuam na regulação das vias de coagulação, tanto intrínseca quanto extrínseca, podendo ativar ou inibir determinados fatores desta cascata, primariamente o fator Xa e a trombina, através, por exemplo, da ligação com as proteínas reguladoras, como a antitrombina. São também substâncias amplamente utilizadas em processos terapêuticos de tratamento de doenças ligadas a trombose venosa ou embolia pulmonar, pois algumas das principais causas de morte no mundo são desordens no sistema

cardiovascular, como conseqüência da trombose (WANG et al., 2007; PUSHPAMALI et al., 2008).

A heparina é o polissacarídeo naturalmente sulfatado amplamente utilizado como agente anticoagulante ou antitrombótico. A posição do grupo sulfato na molécula é essencial para esta atividade, pois a interação do polissacarídeo sulfatado com os cofatores de coagulação e seus alvos de protease são específicos (YANG et al., 2005).

As atividades da heparina são mediadas por antitrombina e por seu co-factor II. A heparina possui em sua estrutura uma seqüência pentassacarídica sulfatada específica que interage com os fatores plasmáticos e induz a ativação conformacional da antitrombina (MELO et al., 2008), tornando-a mais ativa e portanto aumentando o tempo para formação do coágulo.

Apesar dessa função, a heparina pode apresentar alguns resultados indesejados como, por exemplo, a produção de anticorpos por ser de origem animal (MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005 A). Polissacarídeos neutros têm sido sulfatados quimicamente, visando obter moléculas que apresentem o mesmo tipo de ação da heparina sem, entretanto, apresentar os seus efeitos colaterais.

Nas análises realizadas para determinar a capacidade anticoagulante da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada (Tabela 5), foi possível observar que a presença da molécula aumentou o tempo de formação do coágulo no APTT e no TT, de forma dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração da solução utilizada contendo a amostra, maior o tempo necessário para a formação do coágulo. Em relação ao PT não houve uma mudança significativa, o que é condizente com dados da literatura, que mostram que mesmo para a heparina, este teste não se mostra muito sensível (WANG et al, 2007). A glucana nativa também foi testada, mas não inibiu nenhum dos testes, mostrando que a atividade depende da presença do grupamento sulfato.

Trabalhos realizados por Martinichen-Herrero e colaboradores (2005 A e B), mostraram valores semelhantes para glucanas e galactanas sulfatadas.

O APTT é o ensaio que monitora a via intrínseca da coagulação, medindo a função dos fatores XII, XI, IX e VIII, e também dos fatores da via comum (X, V e II). PT avalia a via extrínseca da coagulação que é ativada pelo fator tecidual, uma proteína extra vascular. Além dos fatores da via comum, o PT avalia a função do fator VII. O TT por sua vez, avalia a conversão do fibrinogênio plasmático em fibrina na presença de trombina exógena. O tempo de coagulação na última etapa do sistema de coagulação é a conversão do fibrinogênio em fibrina, pela trombina (MELO et al., 2004, SILVA, HASHIMOTO, 2006).

Os resultados encontrados nos testes mostram que, provavelmente, a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada é um possível inibidor da via intrínseca de coagulação. Para valores de APTT e TT semelhantes aos da heparina, foi necessária uma concentração cinco vezes maior da glucana sulfatada. Desde que o efeito anticoagulante da heparina não é mediado pela modulação do sistema extrínseco, pressupõe-se que esta  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana seja um inibidor não muito potente desta via.

Tabela 5: Atividade anticoagulante de plasma normal humano na presença da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) glucana e da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) glucana sulfatada e heparina em diferentes concentrações, determinada pelos testes clássicos de atividade anticoagulante APTT (Tempo de tromboplastina parcial ativada, TT (tempo de trombina) e PT (Tempo de protrombina). Os resultados representam média e desvio padrão.

Amostra	APTT		TT		PT	
	Plasma ( $\mu$ g/ mL)	Time (s)	Plasma ( $\mu$ g/ mL)	Time (s)	Plasma ( $\mu$ g/ mL)	Time (s)
$\beta$ -D(1-6)- glucana	0	46.65 $\pm$ 0.8	0	19.45 $\pm$ 0.4	0	12.87 $\pm$ 0.8
	1	39.45 $\pm$ 0.2	1	15.92 $\pm$ 0.4	1	16.04 $\pm$ 0.04
	5	39.94 $\pm$ 0.6	5	16.56 $\pm$ 0.5	5	14.87 $\pm$ 0.09
	10	42.30 $\pm$ 0.05	10	14.24 $\pm$ 0.3	10	15.77 $\pm$ 0.07
	15	41.07 $\pm$ 0.7	15	14.53 $\pm$ 0.2	15	14.27 $\pm$ 0.2
	20	41.09 $\pm$ 0.2	20	14.43 $\pm$ 0.4	20	16.87 $\pm$ 0.06
$\beta$ -D-(1-6)- glucana sulfatada	0	46.65 $\pm$ 0.8	0	19.45 $\pm$ 0.4	0	12.87 $\pm$ 0.8
	1	46.79 $\pm$ 0.2	1	15.67 $\pm$ 0.3	1	15.12 $\pm$ 0.02
	5	58.27 $\pm$ 0.1	5	26.75 $\pm$ 1.6	5	17.56 $\pm$ 0.1
	10	70.55 $\pm$ 3.6	10	50.87 $\pm$ 1.1	10	17.52 $\pm$ 0.4
	15	96.97 $\pm$ 1.3	15	70.06 $\pm$ 0.6	15	18.65 $\pm$ 0.2
	20	105.69 $\pm$ 0.06	20	187.54 $\pm$ 1.5	20	18.61 $\pm$ 0.4
	30	228.49 $\pm$ 3.7	30	227.06 $\pm$ 2.2	30	17.45 $\pm$ 0.4
	40	298.13 $\pm$ 1.0	40	249.45 $\pm$ 0.6	40	17.17 $\pm$ 0.7
Heparina <sup>a</sup>	0	46.65 $\pm$ 0.8	0	19.45 $\pm$ 0.4	0	12.87 $\pm$ 0.8
	1	55.60 $\pm$ 0.6	1	95.00 $\pm$ 0.7	1	16.56 $\pm$ 0.2
	2	76.19 $\pm$ 1.0	2	275.98 $\pm$ 1.3	2	17.93 $\pm$ 0.6
	3	106.08 $\pm$ 0.3	3	592.70 $\pm$ 2.9	3	19.20 $\pm$ 0.2

No entanto, para determinar o mecanismo biológico de atuação do polissacarídeo é necessário determinar se ocorreu a potencialização dos co-fatores plasmáticos da cascata de coagulação, predominantemente a antitrombina, que atua

inibindo a trombina e os fatores Xa, XIIa, XIa e IX, e pode ter sua ação reforçada pela presença da heparina. De acordo com Yoon e colaboradores (2002), experimentos baseados na atividade amidolítica permitem uma análise mais refinada da ação anticoagulante de polissacarídeos sulfatados através da ativação da antitrombina. O  $IC_{50}$  é um parâmetro considerado mais apropriado para comparação da atividade nesse tipo de curva.

Os resultados demonstraram que a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada foi capaz de aumentar a ação da antitrombina, com curvas de forma sigmoideal (Figura 16a e 16b) similares às observadas para a heparina. Entretanto, concentrações mais elevadas do polissacarídeo sulfatado foram necessárias para alcançar 50% de inibição da atividade da trombina ( $IC_{50}$ ), quando comparadas às concentrações de heparina requeridas para obter o mesmo efeito. A  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana apresentou um  $IC_{50}$  de 4,4  $\mu$ g/mL nos testes com plasma humano e 0,48  $\mu$ g/mL nos ensaios com a antitrombina purificada, enquanto a heparina mostrou um  $IC_{50}$  de 0,1  $\mu$ g/mL e 0,003  $\mu$ g/mL para os testes com plasma humano e antitrombina, respectivamente.

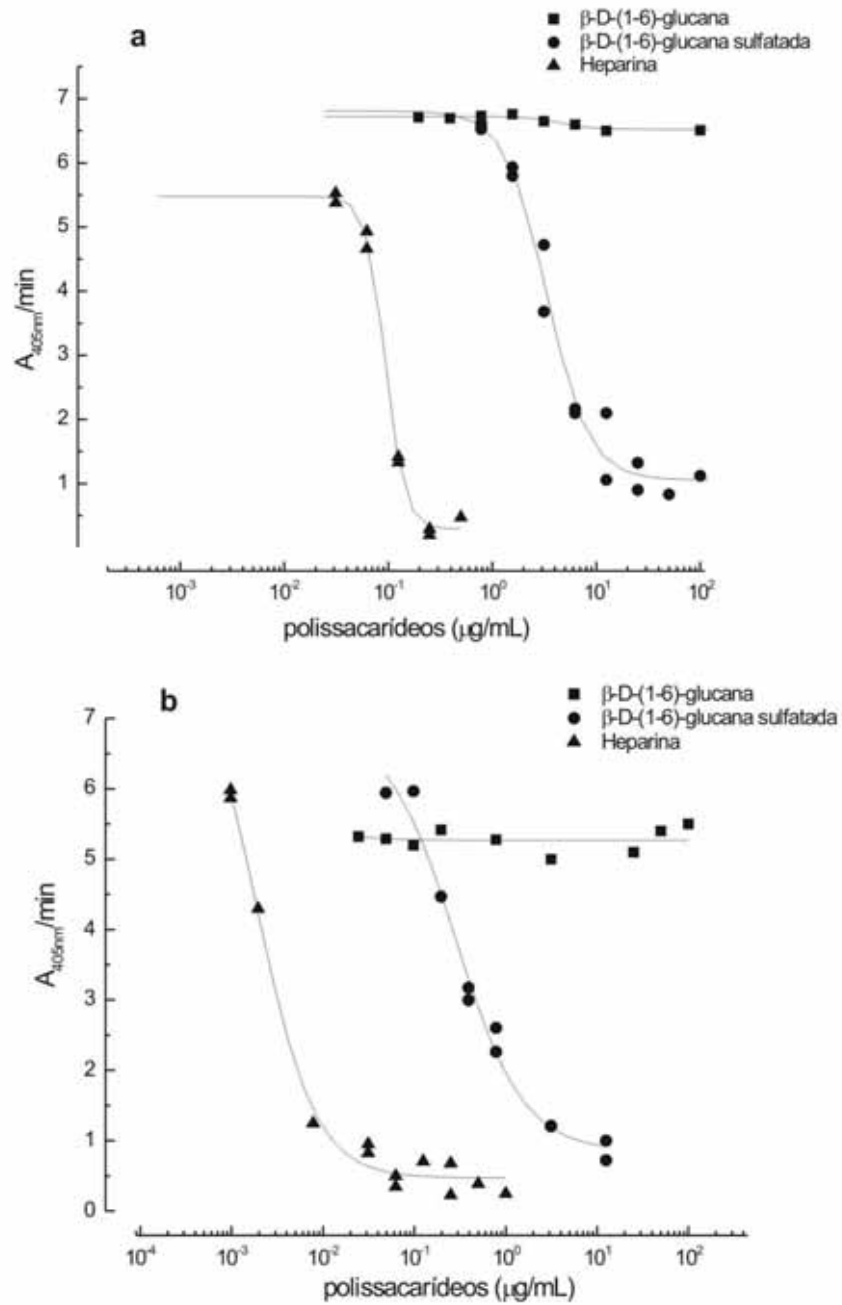


Figura 16: Dependência da concentração das  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)glucana,  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)glucana sulfatada e heparina para a inativação da trombina na presença de plasma humano (a) ou na presença de antitrombina purificada (b).

Comparando os valores de  $IC_{50}$  obtidos nos dois tipos de ensaio, observa-se que a diferença entre a atividade do exopolissacarídeo sulfatado e da



heparina é significativamente menor no ensaio com plasma humano do que no ensaio utilizando a antitrombina purificada ( $IC_{50}$  ~44 vezes e ~160 vezes, respectivamente), mas isso é esperado, pois nesse ensaio utiliza-se o inibidor purificado e não com plasma (que tem outras moléculas que podem interferir no ensaio). Estes resultados sugerem que, além da ativação da antitrombina, o exopolissacarídeo sulfatado pode estar exercendo seu efeito através da potencialização de outro inibidor fisiológico da trombina, o cofator II da heparina (ausente nos ensaios com a antitrombina purificada).

Apesar dos valores mais baixos da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada em relação à heparina, nos testes de atividade biológica, é possível prever que a otimização da reação de sulfatação na glucana poderá fornecer uma molécula com maior DS e, provavelmente, com potencialização de sua atividade anticoagulante.

## 6. CONCLUSÕES

- Todos os isolados de *Botryosphaeria* provenientes de frutas (graviola, manga, pinha e laranja) são produtores de exopolissacarídeos no meio de cultivo, sendo o isolado de laranja o melhor produtor.
- Na cromatografia de filtração em gel os EPS<sub>GRAVIOLA</sub>, EPS<sub>MANGA</sub>, EPS<sub>PINHA</sub> e EPS<sub>LARANJA</sub> eluíram como único pico, demonstrando homogeneidade, principalmente o EPS<sub>LARANJA</sub>, que se apresentou mais homogêneo e menos polidisperso.
- Os procedimentos da caracterização química demonstraram que os EPS<sub>MANGA</sub>, EPS<sub>PINHA</sub> E EPS<sub>LARANJA</sub> são  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucanas lineares, enquanto o EPS<sub>GRAVIOLA</sub> é uma exopolissacarídeo do tipo  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6)-glucana.
- Todas as exoglucanas apresentaram predominância de conformação em tripla hélice, principalmente a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana produzida pelo isolado de laranja.
- O grau de sulfatação apresentados pela  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana quimicamente sulfatada foi de 0,95.
- Os procedimentos de sulfatação aumentam a solubilidade das soluções da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada e induziram a atividade anticoagulante nesta molécula.
- Apesar da  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucana sulfatada apresentar atividade anticoagulante menor do que a heparina, tem potencial para ser aplicada nesse sentido, pois pode ter sua ação potencializada por otimização dos procedimentos de sulfatação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAN, S.; JESKE, W.; WELZEL, D.; FRANZ, G.; FAREED, J. Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic  $\beta$ -1,3-glucan sulfate. **Thrombosis Research**, Nova lorque, v. 78, p. 201-210, 1995.

ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v. 47, p. 267-276, 2002.

ATHUKORALA, Y.; LEE, K.W.; KIM, S.K.; JEON, Y.J. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology** v. 98, p. 1711–1716, 2007.

AMARAL, A.E.; CARBONERO, E.R.; SIMÃO, R.C.G.; KADOWAKI, M.K.; SASSAKI, G.L.; OSAKU, C.A.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. An unusual water-soluble  $\beta$ -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v.72, p.473–478, 2008.

BABITSKAYA, V.G.; SHCHERBA, V.V.; PUCHKOVA, T.A.; SMIRNOV, D.A. Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: Factors affecting their production. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.41, n.2, p.169–173, 2005.

BARBOSA, A.M.; CUNHA, P.D.F.; PIGATTO.M.M.; CORRADI DA SILVA , M.L.. Produção e aplicação de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.25, n.1, p29-42, 2004.

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

BARBOSA, A.M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; DA SILVA, M.L.C. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3,1→6)- $\beta$ -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, p. 1691-1698, 2003.

BEGUIN, S.; LINDHOUT, T.; HEMKER, H.C. The mode of action of heparin in plasma. **Thrombosis Haemostasis**, v. 60, p. 457-62, 1988.

BOHN, J.A.; BeMILLER, J.N. (1→3)- $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v .28, p .3-14, 1995.

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.

BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. Mushrooms, tumors and Immunity: An update. **Exp. Biological Medicine**, v.229, p.393-406, 2004.

BOUVENG, H. O.; LINDBERG, B. Hydrolysis of Methylated Polysaccharides. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.5, p. 296-298, 1965.

BOYER, R.F. **Modern experimental biochemistry**. California: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1993.

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

BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal – Glucan and Mammalian Immunity. **Immunity**, v.19, p.311-315, 2003.

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

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

CAO, W.; LI, X.; LIU, L.; WANG, M.; FAN, H.; 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.

CARBONERO, A. R.; MONTAI, A. V.; MELLINGER, C. G.; ELIASARO, S.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Glucans of lichenized fungi: significance for taxonomy of the genera *Parmotrema* and *Rimelia*. **Phytochemistry**, Nova Iorque, v. 66, p. 929-934, 2005.

CARBONERO, A. R.; TISCHER, C.A.; COSENTINO, C.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a galactomannan from the cyanolichen *Leptogium azureum*. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v. 53, p. 469–473, 2003.

CHAUVEAU, C.; TALAGA, P.; WIERUSZESKI, J. M.; STRECKER, G.; CHAVANT, L. A water-soluble  $\beta$ -D-glucan from *Boletus erythropus*. **Phytochemistry**, Nova Iorque, v. 43, p. 413-415, 1996.

CHEN, L.; SHAO, H.J.; SU, Y.B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus core protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **International Immunopharmacology**, Omaha, v. 4, p. 403-409, 2004.

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

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.; GORIN, P. J.; IACOMINI, M. Unusual carbohydrates from *Parmotrema cetratum*. **Phytochemistry**, Nova lorque, v. 34, p. 715-717, 1993.

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

CORRADI DA SILVA , M.L.; IZELI, N.L.; MARTINEZ, P.F.; SILVA, I.R.; CONSTANTINO, C.J.L.; CARDOSO, M.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 lorque, v. 61, p. 10-17, 2005.

CROGNALE, S.; BRUNO, M.; FIDALEO, M.; MORESI, M.; PETRUCCIOLI, M. Production o β-glucan and related glucan-hydrolases by *Botryosphaeria rhodina*. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v.102, p.860-871, 2007.

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

DE VUYST, L.; VANDERVEKEN, F.; VAN DER VEN, S.; DEGGEST, B. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their grown-associated biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v.84, p.1059-1068, 1998

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova lorque, v. 28, p. 81-88, 2001.

DELMANTO, R. D.; LIMA, P. L. A.; SUGUI, M. M.; EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, Nova lorque, v. 496, p 15-21, 2001.

DELBEN, F.; FORABOSCO, A.; GUERRINI, M.; LIUT, G.; TORRI, G. Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*-II. Nuclear magnetic resonance. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p.545-554, 2006.

DESAI, U.R. New Antithrombin-Based Anticoagulantes, **Medicinal Research Reviews**, v. 24, p. 151-181, 2004.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G.; A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**. v.84, p.106–109, 1962.

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

DU, Y.; GU, G.; HUA, Y.; WEI, G.; YE, X.; YU, G. Synthesis and antitumor activities of glucan derivatives. **Tetrahedron**, Shannon, v.60, p.6345-6351, 2004.

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

ENCINAS, O.; DANIEL, G. Decay capacity of different strains of the blue stain fungus *Lasiodiplodia theobromae* on various wood species. **Material und Organismen**, v. 30, p. 239-258, 1995.

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

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

FUKUDA, E.K.; VASCONCELOS, A.F.D.; MATIAS, A.C.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; CORRADI DA SILVA, M.L. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. **Semina**, Londrina, 2008, *in press*.

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

GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; SILVA, R. Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, In Press, Corrected Proof. doi:10.1016, 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 lorque, v.60, p.43-49, 2005.

GORIN, P. A. J. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. New York. R. L. Whistler and J. N. BeMiller (eds). Academic Press. 1981. v. 38, p.12-104.

GORIN, P. A. J. In: **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. R. L. Whistler, R. L. and BeMiller, J. N. (ed), 38: 13-97. Academic Press, New York, 1980.

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

GORRET, N.; RENARD, C.M.G.C.; FAMELART, M.H.; MAUBOIS, J.L.; DOUBLIER, J.L. Rheological characterization of the EPS produced by *P. acidi-propionici* on milk microfiltrate. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque v.51, p.149-158, 2003.

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.

GUTIÉRREZ, A.; BOCCHINI, P.; GALLETTI, G.; MARTINEZ, A.T. Analysis of ligninpolysaccharide complexes formed during grass lignin degradation by cultures of *Pleurotus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1928-1934, 1996.

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

HAN, F.; YAO, W.; YANG, X.; LIU, X.; GAO, X. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.36, p.201-207, 2005.

HAN, S.B.; LEE, C.W.; JEON, Y.J.; HONG, N.D.; YOO, I.D.; YANG, K-H.; KIM, H.M. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. **Immunopharmacology**, v.41, p.157–164, 1999.

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

HUANG, Q.; ZHANG, L. Solution properties of (1-3)- $\alpha$  -D-glucan and its sulfated derivative from *poria cocos* mycelia via fermentation tank. **Biopolymers**, v. 79, 28-38, 2005.

HUANG, X.; HU, Y.; ZHAO, X.; LU, Y.; WANG, J.; ZHANG, F.; SUN J. Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of astragalus polysaccharide for ND vaccine **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.303–308, 2008.

JIN, Y.; ZHANG, L.; CHEN, L.; CHEN, Y.; CHEUNG, P. C. K.; CHEN, L. Effect of culture media on the chemical and physical characteristics of polysaccharides isolated from *Poria cocos* mycelia. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, p. 1507-1515, 2003.

JOHANSSON, L.; TUOMAINEN, P.; YLINEN, M.; EKHOLM, P.; VIRKKI, L. Structural analysis of water-soluble and -insoluble  $\beta$ -glucans of whole-grain oats and barley. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v. 58, p. 267-274, 2004.

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.

KHAN, T.; PARK, J. K.; KWON, J. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, Nova lorque, v. 24, n. 5, p. 816-826, 2007.

KIHO, T.; YOSHIDA, I.; KATSURAGAWA, M.; SAKUSHIMA, M.; USUI, S.; UKAI, S. A polysaccharide from the fruiting bodies of *Amanita muscaria* and the antitumor activity of its carboxymethylated product. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v.17, p.1460-1462, 1994.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Reviews**, v.26, p. 239-256, 2002.

KOGAN, G. (1→3, 1→6)-β-D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, Karachi, v.23, p.107-152, 2000.

KOLLÁR, R.; PETRAKOVA, E.; ASHWELL, G.; ROBBINS, P. W.; CABIB, E. Architecture of Yeast Cell Wall. **The journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 1170- 1178, 1995.

KRCMAR, P.; NOVOTNY, C.; MARAIAS, M-F; JOSELEAU, J-P. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v.24, p.61-64, 1999.

KUMAR, A.S.; MODY, K. Microbial exopolysaccharides: variety and potential applications. In: Rehm, B.H.A. Microbial production of biopolymers and polymers. **Intl. Specialized Book Service Inc**, p. 229-254, 2009.

LAROCHE, C.; MICHAUD, P. New developments and prospective applications for β(1,3) glucans. **Recent Patents on Biotechnology**, Lovaina, v. 1, p. 59-73, 2007.

LEE, Y. C. Carbohydrate analysis with high-performace anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 720, p. 137-149, 1996.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, Shannon, v. 105, p. 101–114, 2006.

LI, H. Y.; CAO, R. B.; UM, Y. T. . *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobioniae*, and chemical control of *Gummosis disease* of japanese apricot and peach trees in Zhejiang province, China. **Crop Protection**, v. 14, n. 3, p. 187-191, 1995.

LIMA, P. L. A.; DELMANTO, R. D.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. *Letinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating acentos *in vivo*. **Mutation Research**, Nova lorque, v. 496, p. 23-32, 2001.

LIU, C.; LIN, K; GAO, Y; YE, L; XING, Y; XI, T. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque v.67, p.313-318, 2007.



LU, Y.; WANG, D.; HU, Y.; HUANG, X.; WANG, J. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v. 71, p. 180–186, 2008.

MÄHNER, C.; LECHMER, M.D.; NORDMEIER, E.; Synthesis and characterization of dextran and pullulan sulphate. **Carbohydrate Research**. v.331, p.203-208, 2001.

MAJERUS, P.W; BROZE, G.J; MILETICH, J.P; TOLLEFSEN, D, M; **As bases farmacológicas da terapêutica** Fármacos anticoagulantes, trombolíticos e antiplaquetários;. Capítulo 54; 9ªedição; p.991-1005; 1996.

MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R.  $\beta$ -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, Nova lorque, v. 658, p. 154–161, 2008.

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

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 (Eds), Pergamon Press, p.1005-1044, 1985.

MARSH, S.; APPADU, B. Drugs affecting coagulation. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 8, p. 209-213, 2007.

MARTINICHEN, J. C. **Ação anticoagulante de polissacarídeos modificados através de reações de sulfatação**. 2001. 61f. Dissertação (Mestrado) Programa de pós-graduação em Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C., CARBONERO, E.R., GORIN P.A. J., IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. **Carboydrate Polymers**, Nova lorque, v. 60, p. 7-13, 2005A.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C., CARBONERO, E.R., SASSAKI, G.L., GORIN P.A.J., IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 35, p. 97–102, 2005B.

MASCARENHAS, P.; BEHERE, A.; SHARMA, A.; PADWAL-DESAI, S. R. Post-harvest spoilage of mango (*Mangifera indica*) by *Botryodiplodia theobromae*. **Mycology Research**, Houston, v.100, n.1, p. 27-30, 1995.

MASILAMANI, S.; MUTHUMARY, J. Development of conidiomata in *Botryodiplodia theobromae*. **Mycology Research**, Houston, v. 100, n 11, p. 1383-1387, 1996.

MATA, J.A.; BÉJAR, V.; BRESSOLIER, P.; TALLON, R.; URDACI, M.C.; QUESADA E.; LLAMAS, I. Characterization of exopolysaccharides produced by three

moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae*. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v.105, p. 521-528, 2008.

MATA, J.A.; BÉJAR, V.; LLAMAS, I.; ARIAS, S.; BRESSOLIER, P.; TALLON, R.; URDACI, M.C.; QUESADA E. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*, **Research in Microbiology**, Paris, v.157, p.827–835, 2006.

MELO, F.R.; PEREIRA, M.S.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P.A.S. Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides different mechanisms for heparin and sulfated galactans. **The Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v. 279, p. 20824–20835, 2004.

MELO, F.R.; PEREIRA, M.S.; MONTEIRO, R.Q.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P.A.S. Sulfated galactan is a catalyst of antithrombin-mediated inactivation of  $\alpha$ -thrombin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Shanghai, v. 1780, p. 1047–1053, 2008.

MENDES, S.F. **Sulfatação e atividade anticoagulante da botriosferana, uma  $\beta$ -(1→3, 1→6)-d-glucana, produzida por *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 cultivado em frutose como fonte única de carbono.** 2008. 102f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

METHACANON, P.; MADLAB, S.; KIRTIKARAB, K.; PRASITSILA, M. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v. 60, p. 199–203, 2005.

MIHAI, D.; MOCANU, G.; CARPOV, A. Chemical reactions on polysaccharides: I. Pullulan sulfation. **European Polymer Journal**, v.37, p.541-546, 2001.

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

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

MONTREUIL, J.; BOUQUELET, S.; DEBRAY, H.; LEMOINE, J.; MICHALSKI, J-C.; SPIK, G.; STRECKER, G. Glicoproteins. In: M.F. Chaplin and J.F. Kennedy (ed) **Carbohydrate analysis: A practical approach**. 2.ed. Oxford: Oxford University press, 1994, p.181-229.

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

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

MORRIS, G.A.; LI, P.; PUAUD, M.; LIU, Z.; MITCHELL, J.R.; HARDING, S.E. Hydrodynamic characterisation of the exopolysaccharide from the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02: a comparison with xanthan. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v. 44, p. 261-268, 2001.

MUELLER, A.; RAPTIS, J.; RICE, P. J.; KALBFLESCHE, J. H.; STOUT, R. D.; ENSLEY, H.E.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D. L. The Influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1,3)- $\beta$ -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology**, Oxford, v.10, p. 339-346, 2000.

MULLOY, B. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, p. 651-664, 2005.

MULLOY, B.; MOURÃO, P.A.S.; GRAY, E. Structure: function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 77, p. 123–135, 2000.

NAVARINI, L.; ABATANGELO, A.; BERTOCCHI, C.; CONTI, E.; BOSCO, M.; PICOTTI, F. Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* SFi20. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, 219-226. 2001.

NAVARRETE, R.C.; SHAH, S.N. New biopolymer for coiled tubing applications. **Society of Petroleum Engineers 68487**, Richardson, TX, USA, p.1-10, 2001.

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

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

NEVOT, M.; DERONCELÉ, V.; MESSNER, P.; GUINEA, J.; MERCADÉ, E. Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas Antarctica* NF. **Environmental Microbiology**, Braunschweig, v.8, p.1523–1533, 2006.

NIE, X.; SHI, B.; DING, Y.; TAO, W. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 39, p. 228–233, 2006.

O'NEILL, A. N.; Sulphated derivatives of Laminarin. **Canadian Journal Chemistry**, Ottawa, v. 33, p. 1097–1101, 1955.

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

ORTEGA-MORALES, B.O.; SANTIAGO-GARCIA, J.L.; CHAN-BACAB, M.J.; MOPPERT, X.; MIRANDA-TELLO, E.; FARDEAU, M.L.; CARRERO, J.C.; BARTOLO-PÉREZ, P.; VALADÉZ-GONZALEZ, A.; GUEZENNEC, J. **Journal of**

Applied Microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v.102, p. 254–264, 2007.

OSAKU, C.A.; SASSAKI, G.L.; ZANCAN, G.T.; IACOMINI, M. Studies on neutral exopolysaccharides produced by the ectomycorrhiza *Thelephora terrestris*. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v.216, p.145-149, 2002.

PAULSEN, B. S. Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. **Phytochemistry Reviews**, Leiden, v.1, p. 379-387, 2002.

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

PENG, Y.; ZHANG, L.; ZENG, F.; KENNEDY, J.F. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v.59, p.385-392, 2005.

PEREIRA, M.S.; MELO, F.R.; MOURÃO, P.A.S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans. **Glycobiology**, Oxford, v. 12, p. 573-580, 2002.

PESSONI, R. A. B.; FRESHOUR, G.; FIGEIREDO-RIBEIRO, R. L.; HAHN, M. G.; BRAGA, M. R. Cell-wall structure and composition of *Penicillium janczewskii* as affected inulin. **Mycobiologia**, v. 97, p. 304-311, 2005.

PIGATTO, M. M. **Produção de exopolissacarídeo pelo fungo ligninolítico *Botryosphaeria* sp.** 2002. 53p. Monografia - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PUSHPAMALI, W.A.; NIKAPITIYA, C.; DE ZOYSA, M.; WHANG, I.; KIM, S.J.; Lee, J. Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata*. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v. 73, p. 274–279, 2008.

RAMESH, H.P; THARANATHAN, R.N. Carbohydrate – The renewable raw materials of high biotechnological value. **Critical Reviews in Biotechnology**, Ontario, v. 23, p.149-173, 2003.

RAMESH, H.P; THARANATHAN, R.N. Structural characteristics of a mixed linkage  $\beta$ -d-glucan from sorghum (*Sorghum bicolor*). **Carbohydrate Research**, v. 308, p.239-242, 1998.

RAMOS, L .J.; DAVENPORT, T. L.; MCMILLAN, R. T.; LARA, S. P. The resistance of mango (*Mangifera indica*) cultivars to tip dieback disease in Florida. **Plant Disease**, v. 81, p. 509-514, 1997.

RAU, U. Glucans secreted by fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 2, p.30-36, 2004.

RAYACHHETRY, M. B.; ELLIOT, M. L. Evaluation of fungus-chemical compatibility for melaleuca (*Melaleuca quinquenervia*) control. **Weed Technology**, Washington, v.11, p. 64-69, 1997.

RICHERT, L.; GOLUBIC, S.; GU, L.R.; RATISKOL, J.; PAYRI, C.; GUEZENEC, J. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Cyanobacteria Isolated from Polynesian Microbial Mats. **Current Microbiology**, Braunschweig, v.51, p. 379–384, 2005.

ROCHA, F.D.; PEREIRA, R.C.; KAPLAN, M.A.C.; TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v.17, n.4, p.631-639, 2007.

ROUHIER, P.; KOPP, M.; BEGOT, V.; BRUNETEAU, M.; FRITIG, B. Structural Features of Fungal  $\beta$ -D-Glucans for the Efficient Inhibition of the Initiation of Virus Infection on *Nicotiana Tabacum*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 1, p. 57-62, 1995.

ROUT, D.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ISLAM, S.S. The structure and conformation of a water-insoluble 1 $\rightarrow$ 3)-, (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-glucan (from the fruiting bodies of *Pleurotus florida*). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.343, p.982-987, 2008.

ROUX, J.; WINGFIELD, M.J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia mearnsii* in South Africa. **Forest Ecology and Management**, v.99, p.327-336, 1997.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, Melbourne, v. 12, p. 163-171, 2002.

RUAS-MADIEDO, P.; LOS REYES-GAVILAN, C.G. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **American Dairy Science Association**, Savoy, v.88, p.843-856, 2005.

RUBIN-BEJERANO, I.; ABEIJON, C.; MAGNELI, P.; GRISAFI, P.; FINK, G.R. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. **Cell Host & Microbe**, Nova Iorque, v.2, p.55-67, 2007.

RUIJSSENAARS H.J.; STINGELE F.; HARTMANS, S. Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides. **Current Microbiology**, Nova Iorque, v.40, p.194–199, 2000.

SALDANHA, L. **Diversidade genética de isolados de *Botryosphaeria* e a produção de lacases, pectinases e  $\beta$ -1,3-glicanases**. 2006. 78f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

SALDANHA, R.L.; GARCIA, J.E.; DEKKER, R.F.H.; VILAS-BOAS, L.A.; BARBOSA, A.M. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, p.259-264, 2007.

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

SASSAKI, G.L.; FERREIRA, J.C.; GLIENKE-BLANCO, C.; TORRI, G.; TONI, F.D.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Pustulan and branched β-galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v.48, p.385-389, 2002.

SAUDE, N.; JUNTER, G.A. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter \_inelandii*. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 37, p. 895–900, 2002.

SCHMID, F.; STONE, B.A.; MCDUGALL, B.M.; BACIC, A.; MARTIN, K.L.; BROWNLEE, R.T.C.; CHAI, E.; SEVIOUR, R.J. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3;1→6)-β-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. Ex Schlecht. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.331, p. 163-171, 2001.

SCHWEIGER-HUFNAGEL, U.; ONO, T.; IZUMI, K.; HUFNAGEL, P.; MORITA, N.; KAGA, H.; MORITA, M.; HOSHINO, T.; YUMOTO, I.; MATSUMOTO, N.; YOSHIDA, M.; TAKAGI-SAWADA, M.; OKUYAMA, H. Identification of the extracellular polysaccharide produced by the snow mold fungus *Microdochium nivale*. **Biotechnology Letters**, Amsterdam, v. 22; p. 183-187, 2000.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium gluanicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.34, p.51-55, 2002.

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

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

SHAH, V.; RAY, A.; GARG, N.; MADAMWAR, D. Characterization of the extracellular polysaccharide produced by a marine cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and its exploitation toward metal removal from solutions. **Current Microbiology**, Nova lorque, v.40, p. 274-278, 2000.

SHAHINIAN, S.; BUSSEY, H. β-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.35, n.3, p.477-489, 2000.

SHANMUGAM, M.; MODY, K.H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Current Science**, Bangalore, v. 79, p. 1272-1683, 2000.

SHARYPOVA, L.A.; CHATAIGNÉ, G.; FRAYSSE, N.; BECKER, A.; POINSOT, V. Overproduction and increased molecular weight account for the symbiotic activity of the *rkpZ*-modified K polysaccharide from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **Glycobiology**, Oxford, v.16, n. 12, p.1181–1193, 2006.

SHIN, K-S.; YU, K-W.; LEE, H-K.; LEE, H.; CHO, W-D.; SUH, H-J. Production of Anti-Complementary Exopolysaccharides from Submerged Culture of *Flammulina velutipes*. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v.45, n.3, p. 319–326, 2007.

SHINGEL, K.I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.339, p.447-460, 2004.

SILVA, M.F.; FORNARI, R.C.G.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; CICHOSKI, A.J.; CANSIAN, R.L.; LUCCIO, M.D.; TREICHEL, H. Production and characterization of xantham gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, Davis, v.90, p.119–123, 2009.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. Coagulação: visão laboratorial da hemostasia primária e secundária, Rio de Janeiro: **Revinter**, 2006.

SILVEIRA, R. L. V. A.; KRUGNER, T.L.; SILVEIRA, R. I.; GONÇALVES, A. N. Efeito de boro na suscetibilidade de *Eucalyptus citriodora* a *Botryosphaeria ribis* e *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, P. 482-485, 1996.

SINGH, R.S.; SAINI, G.K.; KENNEDY, J.F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque, v.73, p.515–531, 2008.

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

STELUTI, R.M.; GIESE E.C.; PIGATO, M.M.; SUMIYA, A.F.G.; COVIZZI, L.G.; JOB, A.E.; CARDOSO, M.S.; CORRADI DA SILVA, M.L.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Comparation of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 44, p. 480-486, 2004.

SUGAWARA, T.; TAKAHASHI, S.; OSUMI, M.; OHNO, N. Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.339, p.2255-2265, 2004.

SUN, C.; SHAN, C.Y.; GAO, X.D.; TAN, R.X. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced injury by EPS2, an exopolysaccharide from a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp. YS4108. **Journal of Biotechnology**, Bielefeld, v. 115, p. 137–144, 2005.

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

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

TAMADA, Y. Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and the anticoagulant activity **Biomaterials**, v.25, p.377–383, 2004.

TAO, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, C.K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 341, p. 2261-2269, 2006.

TEIXEIRA, A. Z.; IACOMINI, A.M.; GORIN, P. A. J. Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 266 p. 309-314, 1995.

TOIDA, T.; CHAIDEDGUMJORN, A.; LINHARDT, R. Structure and Bioactivity of Sulfated Polysaccharides. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, Gakushuin, v. 15, p. 29–46, 2003.

TRENTO, F.; CATTANEO, F.; PESCADOR, R.; PORTA, R.; FERRO, L. Antithrombin activity of an algal polysaccharide. **Thrombosis Research**, v.102, p.457-465, 2001.

VASCONCELOS, A.F.D.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; SCARPINO, I.S.; REZENDE, M.I. Optimisation of laccase production by *Botryosphaeria sp* in presence of veratryl alcohol by the response surface method. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre-les-Nancy v.35, p.1131-1138, 2000.

VENKATASUBBAIAH, P.; SUTTON, T. B.; CHILTON, W. S. Effect of ptyotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot. **Phytopathology**, v. 81, n. 3, p. 243-247, 1991.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J.; FRANK, J.; YVIN, J.C. Enhancing effects of new biological response modifier  $\beta$ -1,3 glucan sulfate PS3 on immune reactions. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, New York, v. 62, p. 283-288, 2008.

VILLAIN-SIMONNET, A.; MILAS, M.; RINAUDO, M. A new bacterial exopolysaccharide (YAS34). II. Influence of thermal treatments on the conformation and structure. Relation with gelation ability. **Int. J. Biological Macromolecules**, v. 27, p.77-87, 2000.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bull.**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WANG, T.; DENG, L.; LI, S.; TAN, T. Structural characterization of a water-insoluble (1→3)- $\alpha$ -D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. **Carbohydrate Polymers**, v.67, p. 133–137, 2007.

WANG, Y.; ZHANG, M.; RUAN, D.; SHASHKOV, A. S.; KILCOYNE, M.; SAVAGE, A. V.; ZHANG, L. Chemical components and molecular mass of six polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos*. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 327–334, 2004.



WANG, Z.M.; LI, L.; ZHENG, B.S.; NORMAKHAMATOV, N.; GUO, S.Y. Preparation and anticoagulation activity of sodium cellulose sulfate **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 41, p. 376–382, 2007.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Review. Immunology**, Houston, v. 19, p. 65-96, 1999.

WHISTLER, R.L.; SPENCER, W.W.; Sulfation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York. v. 4, p. 235-275, 1964.

WILLIAMS, D. L., Overview of (1→3)-β-D-Glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, Rotterdam, v.6, p. 247-250, 1997.

WILLIAMS, W. J.; BEUTLER, E.; ERSIEV, A. J.; RUNDLES, R. W.. **Hematologia. Guanabara Koogan**, 1142-1149, 1976

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.

WU, S.J.; CHUN, M. W.; SHIN, K.H., TOIDA, T.; PARK Y.; LINHARDT R.J.; KIM Y.S. Chemical Sulfonation and Anticoagulant Activity of Acharan Sulfate. **Thrombosis Research**, v. 92, p. 273-281, 1998.

YANG, J.; DU, Y.; WEN, Y.; LI, T.; HU, L.; Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**. v.52, p.397–403, 2003.

YANG, X.B.; GAO, X.D.; HAN, F.; TAN, R.X. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, Shanghai, v. 1725, p. 120 – 127, 2005.

YOON, S.J.; PEREIRA, M.S.; PAVÃO, M.S.G.; HWANG, J.K.; PYUN, Y.R.; MOURÃO, P.A.S. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. **Thrombosis Research**, Nova Iorque, v. 106, p. 51–58, 2002.

YOUNG, S.H.; JACOBS, R.R. Sodium hydroxide-induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 310, p. 91-99, 1998.

YUAN, Z. Q.; MOHAMMED, C. Investigation of fungi associated with stem cankers of eucalypts in Tasmania, Australia. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 26, p. 78-84, 1997.

YURLOVA, N.A.; HOOG, G.S. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide, nutritional physiology and molecular features. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 72, p. 141-147, 1997.

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

ZHANG, H.; LIN, Z. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shangai, v. 25, n. 2, 191-195, 2004.

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

ZHANG, H-J.; MAO, W-J.; FANG, F.; LI, H-Y.; SUN, H-H.; CHEN, Y.; QI, X-H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, V. 71, P. 428-434, 2008.

ZHANG, J.; TANG, O.; ZIMMERMAN-KORDMANN, M.; REUTTER, W.; FAN, H. Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. **Life Sciences**, v. 71, p. 623–638, 2002.

ZHANG L.; YANG, L.; DING, Q.; CHEN, X. Studies on molecular weights of polysaccharides of *Auricularia auricula-judae*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.270, p. 1-10, 1995.

ZHANG, L.; ZHANG, M.; DONG, J.; GUO, JI.; SONG, Y.; CHEUNG, P.C.K. Chemical structure and chain conformation of the water-insoluble glucan isolated from *Pleurotus tuber-regium*. **Biopolymers**, Malden, v.59, p.457–464, 2001.

ZHANG, M.; ZHANG, L.; WANG, Y.; CHEUNG, P.C.K. Chain conformation of sulfated derivatives of  $\beta$ -glucan from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.338, p.2863-2870, 2003.

ZHANG, L.; ZHANG, M.; ZHOU, Q.; CHEN, J.; ZENG, F. Solution properties of antitumor sulfated derivative of  $\alpha$ -(1→3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. **Biosciences of Biotechnology and Biochemistry**. v. 64, p. 2172-2178, 2000.

ZUNIGA, E.; MATSUHIRO, B.; MEJIAS, E. Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, Nova lorque, v.66, p.208–215, 2006

## ANEXO

**Artigo Científico:** “Three exopolysaccharides of the  $\beta$ -(1-6)-D-glucan type and a  $\beta$ -(1-3;1-6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit”. **Carbohydrate Research**, v. 343, 2481-2485, 2008.



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carres](http://www.elsevier.com/locate/carres)

Note

## Three exopolysaccharides of the $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan type and a $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit

Ana Flora D. Vasconcelos<sup>a,b</sup>, Nilson K. Monteiro<sup>a</sup>, Robert F. H. Dekker<sup>c</sup>, Aneli M. Barbosa<sup>d</sup>, Elaine R. Carbonero<sup>e</sup>, Joana L. M. Silveira<sup>e</sup>, Guilherme L. Sasaki<sup>e</sup>, Roberto da Silva<sup>b,f</sup>, Maria de Lourdes Corradi da Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, CP 467, CEP 19060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Universidad de Castilla—La Mancha, Instituto de Regional Investigación Científica Aplicada (IRICA), 13071 Ciudad Real, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia—CCE, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 March 2008

Received in revised form 9 June 2008

Accepted 11 June 2008

Available online 19 June 2008

## Keywords:

*Botryosphaeria rhodina* isolates

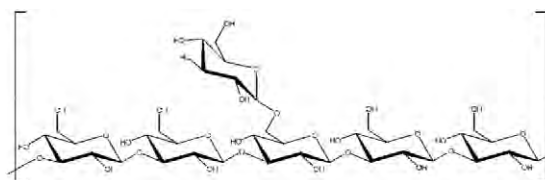
Exopolysaccharides

 $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)-D-Glucans $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)-D-Glucans

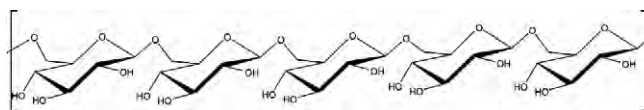
Triple-helix conformation

## ABSTRACT

Four exopolysaccharides (EPS) obtained from *Botryosphaeria rhodina* strains isolated from rotting tropical fruit (graviola, mango, pinha, and orange) grown on sucrose were purified on Sepharose CL-4B. Total acid hydrolysis of each EPS yielded only glucose. Data from methylation analysis and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy indicated that the EPS from the graviola isolate consisted of a main chain of glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) linkages substituted at O-6 as shown in the putative structure below:



The EPS of the other fungal isolates consisted of a linear chain of (1 $\rightarrow$ 6)-linked glucopyranosyl residues of the following structure:



FTIR spectra showed one band at 891 cm<sup>-1</sup>, and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy showed that all glucosidic linkages were of the  $\beta$ -configuration. Dye-inclusion studies with Congo Red indicated that each EPS existed in a triple-helix conformational state.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glucans produced as exocellular polysaccharides by fungi are uncommon.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Basidiomycetous<sup>1–3</sup> and ascomycetous fungi<sup>4,5</sup> have been used to obtain extracellular D-glucans, mainly  $\beta$ -glucans, and in particular, the more common (1 $\rightarrow$ 3)- and (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-linked polysaccharides.<sup>6</sup> Among them are scleroglucan, schizophyllan, and lentinan,

the most common fungal D-glucans.<sup>7,8</sup> It is now well recognized that  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucans, including those of mixed  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6) glucosidic linkages, are biological response modifiers (BRMs) as they are able to stimulate the nonspecific (innate) immune system of animals.<sup>9</sup> According to some reports, the presence of branches on C-6 and a triple-helix conformation are important factors influencing BRM activities.<sup>9–11</sup>

\* Corresponding author. Tel.: +55 18 32295355; fax: +55 18 32215682.  
E-mail address: [corradi@fct.unesp.br](mailto:corradi@fct.unesp.br) (M. de Lourdes Corradi da Silva).

$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glucans play a central role in the molecular organization of the cell wall of yeast and filamentous fungi.<sup>12–14</sup> In *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucans are important because they anchor the mannoproteins in the cell wall and are interconnected to the  $\beta$ -1,3-glucans and chitin.<sup>15</sup> The literature records few extracellular produced  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucans. Among them is a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan (lutean) produced by *Penicillium luteum* Zukal,<sup>16</sup> which although having a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan backbone, carries O-malonyl groups. However, its chemical analysis suggests that linkages other (1 $\rightarrow$ 6) may be present. Sasaki et al.<sup>17</sup> on the other hand found a typical unbranched  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan produced by the causal agent of citrus black spot, *Guignardia citricarpa*, when grown on glucose as the carbon source.

The ascomycete, *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, produces a family of botryosphaerans ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-D-glucans<sup>5</sup>) when cultured on different carbohydrate substrates with highest yields produced on sucrose.<sup>18,19</sup> The cell wall of this fungal isolate furthermore produced a series of D-glucans including a mixed-linked  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-glucan and a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan, in addition to a starch-like glucan.<sup>20</sup>

We now report on the exopolysaccharides produced by four isolates of *B. rhodina* obtained from rotting tropical fruits (graviola, mango, pinha, and orange). These strains were grown on sucrose as sole carbon source, and are designated EPS<sub>SUC-1</sub>, EPS<sub>SUC-2</sub>, EPS<sub>SUC-3</sub>, and EPS<sub>SUC-4</sub>, respectively. With the exception of the graviola isolate, three *B. rhodina* isolates produced  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucans as the sole exopolysaccharide. This finding is uncommon considering that these D-glucans are usually found as cell-wall components in yeasts and fungi, but nevertheless are common in lichens<sup>21</sup> (e.g., pustulan).

**Table 1**

GC–MS data arising from the methylation analyses of EPS produced by *Botryosphaeria rhodina* strains isolated from graviola, mango, pinha, and orange fruits

Polysaccharide	Components <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> <sup>b</sup>	Mole percent (%)	Linkage
EPS <sub>SUC-1</sub>	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	23	GlcP-(1 $\rightarrow$
	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.82	56	$\rightarrow$ 3)-GlcP-(1 $\rightarrow$
	2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	4.20	21	$\rightarrow$ 3,6)-GlcP-(1 $\rightarrow$
EPS <sub>SUC-2</sub>	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	0.6	GlcP-(1 $\rightarrow$
	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	2.20	99.4	$\rightarrow$ 6)-GlcP-(1 $\rightarrow$
EPS <sub>SUC-3</sub>	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	0.7	GlcP-(1 $\rightarrow$
	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	2.20	99.3	$\rightarrow$ 6)-GlcP-(1 $\rightarrow$
EPS <sub>SUC-4</sub>	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	0.5	GlcP-(1 $\rightarrow$
	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	2.20	99.5	$\rightarrow$ 6)-GlcP-(1 $\rightarrow$

<sup>a</sup> 2,3,4,6-tetra-O-Me-Glc = 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose, etc.

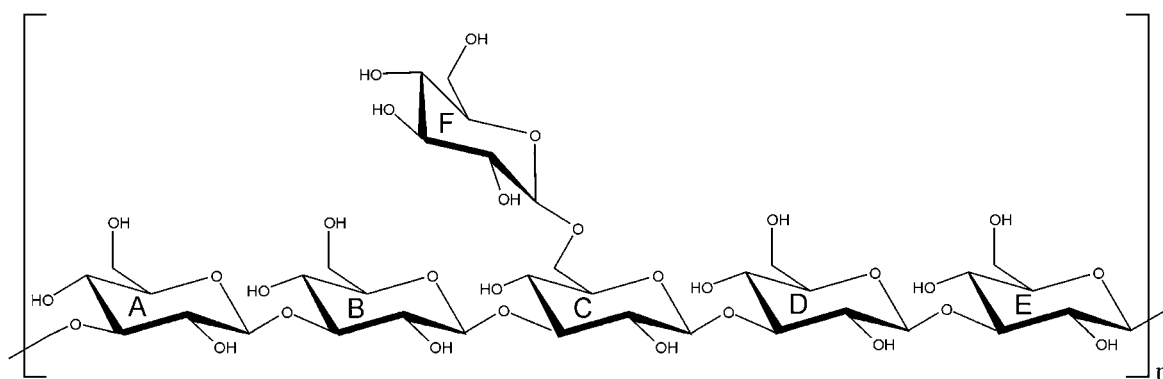
<sup>b</sup> Retention times of the corresponding alditol acetates compared to 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucose.

The amount of EPS produced by each *B. rhodina* isolate when grown on sucrose was 1.5, 0.4, 1.3, and 1.8 g/L for EPS<sub>SUC-1</sub>, EPS<sub>SUC-2</sub>, EPS<sub>SUC-3</sub>, and EPS<sub>SUC-4</sub>, respectively, and with the exception of EPS<sub>SUC-2</sub>, these yields were similar to that of botryosphaeran (1.2 g/L)<sup>5,18</sup> produced under the same growth conditions. The crude EPS preparations contained mainly carbohydrate (>95%) and lesser amounts of protein (<5%). The EPS produced by each of the fungal isolates was purified by gel-permeation chromatography on Sepharose CL-4B with each polysaccharide sample eluting as a single peak after the void volume, indicating that they were homogeneous. Total acid hydrolysis showed only glucose as the monosaccharide for each EPS sample.

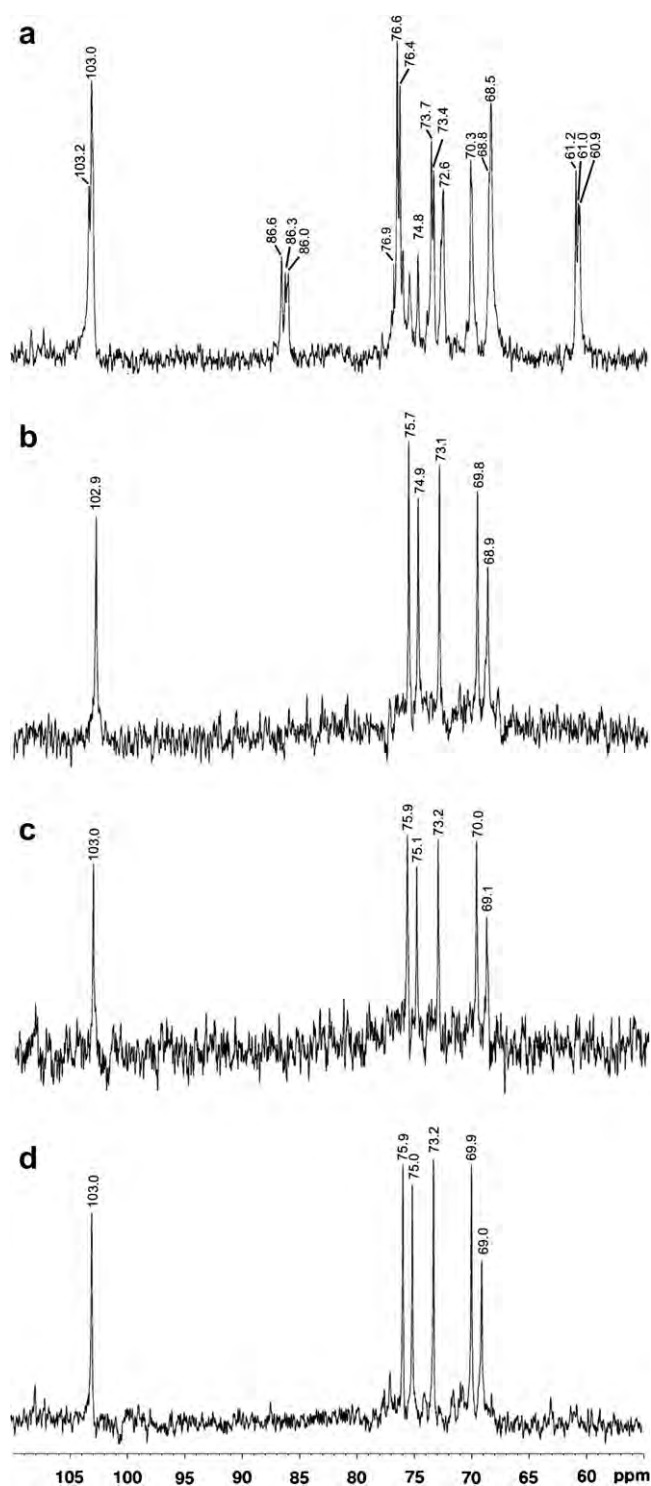
Methylation analysis of EPS<sub>SUC-1</sub> (Table 1) showed 2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucose, 2,4,6-tri-O-methyl-glucose, and 2,4-di-O-methyl-glucose as the main methylated sugar derivatives in the molar percentages of 23:56:21, respectively. These results demonstrated that EPS<sub>SUC-1</sub> was a glucan consisting of a (1 $\rightarrow$ 3)-linked glucosyl backbone substituted with approx. 20% branching at C-6. By contrast, methylation and GC–MS analyses of EPS<sub>SUC-2</sub>, EPS<sub>SUC-3</sub>, and EPS<sub>SUC-4</sub> (Table 1) gave rise to partially O-methylated alditol acetates corresponding to 6-O-substituted (~99%), and nonreducing end units of glucopyranose (~1%), indicating a linear structure. This evidence indicated that these exopolysaccharides were (1 $\rightarrow$ 6)-glucans.

FTIR spectra of each of the four EPS samples showed bands at 891 cm<sup>-1</sup> and 1371 cm<sup>-1</sup> indicating that all the glucosidic linkages were of the  $\beta$  configuration (see Supplementary data, Fig. S1). Bands at 1150, 1110, and 1040 cm<sup>-1</sup> are indicative of glucose.<sup>22,23</sup> These results demonstrated that the four EPS samples produced by isolates of *B. rhodina* were  $\beta$ -glucans.

The <sup>13</sup>C NMR spectrum (Fig. 2a) of EPS<sub>SUC-1</sub> showed two anomeric signals: one at 103.2 ppm that corresponded to nonreducing end units (Fig. 1, residue F), while the other at 103.0 ppm was due to 3-O-substituted and 3,6-di-O-substituted units (Fig. 1, residues A, B, C, D, and E). The  $\beta$ -anomeric configuration for glucopyranosyl units was shown by the C-1 signals at low field.<sup>24</sup> The signals at 86.6 (residues A and E) and 86.3 ppm (residues B and D) ppm were attributable to substitutions at O-3, while that at 86.0 ppm arose from 3,6-di-O-substituted units (residue C) and that at 76.9 ppm corresponded to C-3 of the nonreducing end units (residue F). Resonances at 68.8 ppm arose from substitutions at O-6 (residue C), while those at 61.2 ppm (residues A and E), 61.0 (residues B and D) and 60.9 ppm (residue F) arose from nonsubstituted C-6. The C-6 signals were confirmed from the inverted signal of the DEPT spectrum (data not shown). The signals were similar to those found in other polysaccharides.<sup>24–26</sup> Methylation and NMR data suggested that the degree of branching along the  $\beta$ -1,3-glucan chain at C-6 was about 20%. From this, we conclude that EPS<sub>SUC-1</sub> has a backbone of (1 $\rightarrow$ 3)-linked  $\beta$ -D-glucopyranosyl residues, with



**Figure 1.** Putative structure of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan (1).



**Figure 2.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of exopolysaccharides from *Botryosphaeria rhodina* isolates (a): EPS<sub>SUC-1</sub>; (b): EPS<sub>SUC-2</sub>; (c): EPS<sub>SUC-3</sub>, and (d): EPS<sub>SUC-4</sub>.

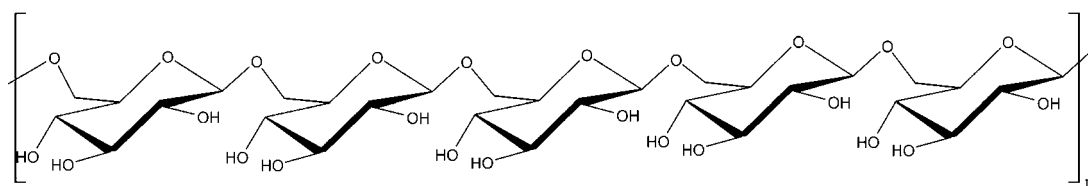
one single  $\beta$ -D-glucopyranosyl branch substituted at O-6 on average for every five backbone units, giving rise to a putative structure as shown in Figure 1. In this respect, its structure is somewhat similar to botryosphaeran from another *B. rhodina* strain (MAMB-05, isolated from a stem canker on a eucalyptus tree) in branching frequency, but having different substituent appendages (viz., glucose and gentiobiose residues).<sup>5</sup>

The  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of EPS<sub>SUC-2</sub>, EPS<sub>SUC-3</sub>, and EPS<sub>SUC-4</sub> showed them to be polymers with the  $\beta$ -configuration by virtue of a typical low-field C-1 signal at 103.0 ppm for EPS<sub>SUC-3</sub> and 102.9 ppm for EPS<sub>SUC-2</sub>. The signal corresponding to the anomeric carbon of  $\alpha(1\rightarrow6)$  linkages ( $\sim 99$  ppm)<sup>27</sup> was not detected. Typical of glucose homopolymers, their  $^{13}\text{C}$  NMR spectra contained six signals (Fig. 2b–d). The chemical shifts 75.7/75.9/75.9 ppm, 74.9/75.1/75.0 ppm, 73.1/73.2/73.2, and 69.8/70.0/69.9 ppm were attributed, respectively, to C-3, C-5, C-2, and C-4 to EPS<sub>SUC-2</sub>/EPS<sub>SUC-3</sub>/EPS<sub>SUC-4</sub>. The absence of a signal close to 60.0–61.0 ppm, and the presence of chemical shifts between 68.9 and 69.1 ppm, indicates that these exopolysaccharides are (1 $\rightarrow$ 6)-linked glucans<sup>17,20</sup> (see Fig. 3). Preliminary experiments using a  $\beta$ -glucanase preparation from *Trichoderma harzianum* Rifai containing  $\beta$ -1,6-glucanase activity demonstrated that these exopolysaccharides were hydrolyzed, liberating glucose and gentiobiose.

Sasaki et al.<sup>17</sup> isolated and identified a similar exocellular  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan from *G. citricarpa* grown on a nutrient medium containing glucose. But when the glucose was replaced by sucrose, it produced an exocellular  $\beta$ -galactan in the furanoside form. Fungal exopolysaccharides of the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan type are uncommon, if not rare, according to a literature search, as these polysaccharides exist mainly as constituents of the cell wall. The reason why the *B. rhodina* isolates from mango, pinha, and orange produce exocellular soluble  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucans is unknown. These could arise during synthesis and remodeling processes executed during cell growth<sup>15</sup> and are exported into the extracellular fluid. The fact that they are produced in water-soluble form by these isolates is novel, and this will open up avenues for their production and applications as BRM polysaccharides in view of recent developments by Rubin-Bejerano et al.<sup>28</sup> In their study,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucans were demonstrated against expectation to be more active immunostimulants of human neutrophils than the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans. Furthermore, they revealed that soluble  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucans were a major stimulatory component of both phagocytosis and reactive oxygen species production.

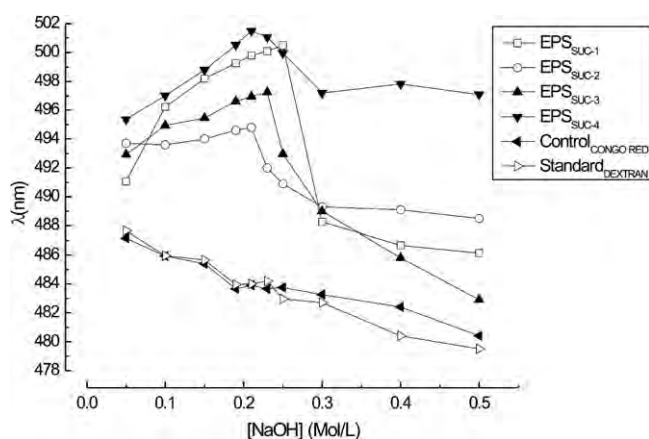
Many (1 $\rightarrow$ 3)- and mixed-linked (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucans adopt ordered helical conformations in aqueous solution,<sup>29,30</sup> and this property is important for BRM activity.<sup>9</sup> The intramolecular force maintaining a single-helical conformation and the intermolecular force that maintains the triple-helical conformation are hydrogen bonds.<sup>9</sup> Increasing the temperature in aqueous solutions above transition temperature, or dissolving the molecules in either dimethyl sulfoxide or aqueous alkali (>0.18–0.25 M NaOH/KOH) will disrupt hydrogen bonding causing transition from triple-helix to single-helix, and single-helix to random coil conformational states.<sup>9,31</sup>

According to Ogawa et al.,<sup>32</sup> polysaccharides existing in an ordered conformation form a complex with Congo Red in dilute NaOH solution as denoted by a shift in the  $\lambda_{\text{max}}$ , whereas they



**Figure 3.** Structure of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan (2).





**Figure 4.** Helix-coil transition analysis of EPS isolated from strains of *Botryosphaeria rhodina* according to the change in the absorption maximum of Congo red-polysaccharide complex at various concentrations of NaOH. Congo red in NaOH and Dextran served as controls.

practically behave as a random coil at higher concentrations. Figure 4 shows the shift of  $\lambda_{\max}$  at different concentrations of NaOH in the presence of the exopolysaccharides. At low concentrations (0.05–0.25 M), the  $\lambda_{\max}$  shifted to a longer wavelength; 501.5 nm for EPS<sub>SUC-4</sub>, and 500.5 nm for EPS<sub>SUC-1</sub>. When the NaOH concentration was increased by more than 0.20 M, the  $\lambda_{\max}$  dropped for EPS<sub>SUC-2</sub>, EPS<sub>SUC-3</sub>, and EPS<sub>SUC-4</sub> (all  $\beta(1\rightarrow6)$ -glucans), and only after 0.25 M for EPS<sub>SUC-1</sub> (a  $\beta(1\rightarrow3,1\rightarrow6)$ -D-glucan). This suggests that they probably adopted a highly ordered conformation, which remained stable even under strong alkaline conditions. This finding was in agreement with that observed for botryosphaeran, an EPS produced by another *B. rhodina* strain, viz., MAMB-05, which also existed in a triple-helix conformation.<sup>33</sup> At various NaOH concentrations, the shift of maximum wavelength of the control and dextran (standard) was observed. But the phenomenon was different from those of the samples. So no shift was observed for dextran, an  $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-glucan that does not exist in a helix conformation.

## 1. Experimental

### 1.1. Microorganism and growth conditions

Four fungal isolates of ascomycetes, morphologically identified as *Lasiodiplodia theobromae*, and molecularly classified as *B. rhodina* (anamorphic form)<sup>34</sup> were obtained from different Brazilian tropical fruit rots. They included: *B. rhodina* MMGR (isolated from graviola, *Annona muricata*), *B. rhodina* MMMFR (mango, *Mangifera* sp.), *B. rhodina* MMPI (pinha, *Annona squamosa*), and *B. rhodina* MMLR (orange, *Citrus* sp.). The isolates were maintained at 4 °C on potato-dextrose agar.<sup>35</sup> The conditions of fungal growth were those as previously described for the production of botryosphaeran by *B. rhodina* MAMB-05,<sup>5</sup> except that commercial sucrose (50 g/L) was used as the sole carbon source for exopolysaccharide production according to Steluti et al.<sup>18</sup>

### 1.2. Preparation of exopolysaccharides

Cell-free culture fluid was obtained after removal of the mycelium by centrifugation (5500g/20 min) at 4 °C. The supernatants were treated with three volumes of absolute ethanol. The precipitated material was recovered and dissolved in distilled water, followed by extensive dialysis (MW cut-off 12,000 Da) against frequent changes of distilled water over 48 h, and then freeze-dried. The EPS produced by *B. rhodina* MMGR, *B. rhodina* MMMFR,

*B. rhodina* MMPI, and *B. rhodina* MMLR were designated, respectively, as EPS<sub>SUC-1</sub>, EPS<sub>SUC-2</sub>, EPS<sub>SUC-3</sub>, and EPS<sub>SUC-4</sub>.

### 1.3. Analytical techniques

Total sugars were determined by the phenol-sulfuric acid method<sup>36</sup> with D-glucose as the standard. Protein was measured by the method of Bradford<sup>37</sup> using bovine serum albumin as the standard.

### 1.4. Homogeneity of the exopolysaccharides

The homogeneity of the exopolysaccharides was determined by gel-permeation chromatography on a Sepharose CL-4B column (1.5 × 30 cm) by applying 1 mg of each of the 4 crude exopolysaccharide samples dissolved in water (1.5 mL). The columns were eluted with distilled water at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions (1.5 mL) were collected and analyzed for carbohydrate and monitored for protein at 280 nm.

### 1.5. Composition analysis of exopolysaccharides

Each of the four purified exopolysaccharide samples (50  $\mu$ g total sugar) were hydrolyzed with 5 M trifluoroacetic acid at 100 °C in a sealed-tube for 15 h.<sup>20</sup> Excess acid was removed by co-distillation with water after hydrolysis was completed, and the aliquots were analyzed by HPAEC-PAD (high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection).

### 1.6. HPAEC-PAD analysis

Acid hydrolysates (50  $\mu$ g) of each EPS sample were dissolved in pure water (1.25 mL). Twenty-five microlitres of these solutions were used for anion-exchange chromatographic analysis by HPAEC-PAD using a Dionex DX-500 chromatography system equipped with a CarboPac PA-1 column (4 × 250 mm) and a PA-1 guard-column at a flow rate of 1.0 mL/min, eluting with 14 mM NaOH (a mixture of water and 200 mM NaOH) as described by Corradi da Silva et al.<sup>19</sup>

### 1.7. Methylation analysis of exopolysaccharides

Each of the four EPS samples (10 mg) was methylated (3 times) using the procedure described by Haworth<sup>38</sup> and outlined by Ciucanu and Kerek.<sup>39</sup> The methylated products were isolated by partitioning in a CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O mixture, and the organic phase containing the methylated sugars was washed ten times with 4 mL of water and dried. The methylated products were hydrolyzed using 45% formic acid (1 mL) at 100 °C for 15 h, then reduced with sodium borohydride and acetylated with 1:1 acetic anhydride-pyridine as described by Corradi da Silva et al.<sup>19</sup> The products were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 ITD R-12 mass spectrometer. The capillary columns (30 m × 0.25 i.d.) used were (a) OV-225, and (b) DB-210, and were held at 50 °C for 1 min during injection, and then programmed at 40 °C/min to 220 °C (constant temperature).

### 1.8. Spectroscopic analyses

<sup>13</sup>C DEPT and <sup>13</sup>C NMR determinations were carried out using a 400-MHz Bruker model DRX Avance Fourier transform spectrometer. Samples (~20 mg) were dissolved in Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> and examined at 50 or 70 °C. Chemical shifts are expressed in ppm relative to the resonance of Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> at 39.70 for samples examined in this solvent. FTIR analyses were run using discs containing polysaccha-

ride (1 mg) and KBr (250 mg). FTIR spectra were recorded on a Bruker Vector 22 Model FTIR Spectrometer. Scans were conducted in the range of 1800–500 cm<sup>-1</sup>.

### 1.9. Helix–coil transition assay

Solutions of each EPS sample (1 mg/mL) in 0.0–0.4 M NaOH (increasing stepwise by 0.05 M increments) were prepared containing 91 μM of Congo Red.<sup>33,40,41</sup> After a 3-h reaction, visible absorption spectra were recorded from 400 to 700 nm at 25 °C with a Shimadzu 1601 UV–vis spectrophotometer.

### Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP (05/53879-3), Fundação Araucária (Projeto 5777), PROPPG-UDEL, and Pronex/Carboidratos for financial support. Dr. M. Menezes (Dept. de Fitosanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brazil) is thanked for provision of the different *Botryosphaeria* isolates. EC Giese is thanked for assistance with the enzymatic hydrolyses of EPS<sub>SUC-2-4</sub>. AFD Vasconcelos and NK Monteiro gratefully acknowledge CAPES and CNPq-PIBIC, respectively, for scholarships.

### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.carres.2008.06.013.

### References

- Delmanto, R. D.; Lima, P. L. A.; Sugui, M. M.; Eira, A. F.; Salvadori, D. M. F.; Speit, G.; Ribeiro, L. R. *Mutation Res.* **2001**, *496*, 15–21.
- Lima, P. L. A.; Delmanto, R. D.; Sugui, M. M.; Eira, A. F.; Salvadori, D. M. F.; Speit, G.; Ribeiro, L. R. *Mutation Res.* **2001**, *496*, 23–32.
- Chen, L.; Shao, H. J.; Su, Y. B. *Int. J. Immunopharmacol.* **2004**, *4*, 403–409.
- Selbmann, L.; Stinglele, F.; Petruccioli, M. *Antonie van Leeuwenhoek* **2003**, *84*, 135–145.
- Barbosa, A. M.; Steluti, R. M.; Dekker, R. F. H.; Cardoso, M. S.; Corradi da Silva, M. L. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1691–1698.
- Laroche, C.; Michaud, P. *Recent Pat. Biotechnol.* **2007**, *1*, 59–73.
- Du, Y.; Gu, G.; Hua, Y.; Wei, G.; Ye, X.; Yu, G. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6345–6351.
- Chen, J.; Seviour, R. *Mycol. Res. Ill* **2007**, 635–652.
- Leung, M. Y. K.; Liu, C.; Koon, J. C. M.; Fung, K. P. *Immunol. Lett.* **2006**, *105*, 101–114.
- Borchers, A. T.; Stern, J. S.; Hackman, R. M.; Keen, C. L.; Gershwin, M. E. *Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**, *221*, 281–293.
- Surenjav, U.; Zhang, L.; Xu, X.; Zhang, X.; Zeng, F. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *63*, 97–104.
- Kollár, R.; Petrakova, E.; Ashwell, G.; Robbins, P. W.; Cabib, E. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1170–1178.
- Shahinian, S.; Bussey, H. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 477–489.
- Vink, E.; Rodriguez-Suarez, R. J.; Gerard-Vincent, M.; Ribas, J. C. *Yeast* **2004**, *21*, 1121–1131.
- Lesage, G.; Bussey, H. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 317–343.
- Anderson, C. G.; Haworth, W. N.; Raistrick, H.; Stacey, M. *Biochem. J.* **1939**, *33*, 272–279.
- Sasaki, G. L.; Ferreira, J. C.; Glienke-Blanco, C.; Torri, G.; Toni, F. D.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *48*, 385–389.
- Steluti, R. M.; Giese, E. C.; Pigatto, M. M.; Sumiya, A. F. G.; Covizzi, L. G.; Job, A. E.; Cardoso, M. S.; Corradi da Silva, M. L.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M. *J. Basic Microbiol.* **2004**, *44*, 480–486.
- Corradi da Silva, M. L.; Izeli, N. L.; Martinez, P. F.; Silva, I. R.; Constantino, C. J. L.; Cardoso, M. S.; Barbosa, A. M.; Dekker, R. F. H. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *61*, 10–17.
- 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.; Sasaki, G. L.; Carbonero, E. R. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 793–798.
- Pereyra, M. T.; Prieto, A.; Bernabé, M.; Leal, J. A. *Lichenologist* **2003**, *35*, 177–185.
- Gutiérrez, A.; Bocchini, P.; Galletti, G.; Martinez, A. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1928–1934.
- Zhao, G.; Kan, J.; Li, Z.; Chen, Z. *Int. J. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 1436–1445.
- Carbonero, E. R.; Gracher, A. H. P.; Smirdede, F. R.; Rosado, F. R.; Sasaki, G. L.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *66*, 252–257.
- Smiderle, F. R.; Carbonero, E. R.; Mellinger, C. G.; Sasaki, G. L.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2189–2196.
- Rout, D.; Mondal, S.; Chakraborty, I.; Islam, S. S. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 982–987.
- Lazaridou, A.; Roukas, T.; Biliaderis, C. G.; Vaikousi, H. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 122–132.
- Rubin-Bejerano, I.; Abeijon, C.; Magnelli, P.; Grisafi, P.; Fink, G. R. *Cell Host Microbe* **2007**, *2*, 55–67.
- Ramesh, H. P.; Tharanathan, R. N. *Carbohydr. Res.* **1998**, *308*, 239–243.
- Dong, Q.; Jia, L.-M.; Fang, J.-N. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 791–795.
- Falch, B. H.; Espevik, T.; Ryan, L.; Stokke, B. T. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 587–596.
- Ogawa, K.; Hatano, M. *Carbohydr. Res.* **1978**, *67*, 527–535.
- Giese, E. C.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M.; da Silva, R. *Carbohydr. Polym.* **2008**, doi:10.1016/j.carbpol.2008.04.038.
- Saldanha, R. L.; Garcia, J. E.; Dekker, R. F. H.; Vilas-Boas, L. A.; Barbosa, A. M. *Braz. J. Microbiol.* **2007**, *38*, 259–264.
- Barbosa, A. M.; Dekker, R. F. H.; Hardy, G. E. *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *23*, 93–96.
- Dubois, N.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356.
- Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- Haworth, W. N. *J. Chem. Soc.* **1915**, *107*, 8–16.
- Ciucanu, J.; Kerek, F. A. *Carbohydr. Res.* **1984**, *13*, 209–217.
- Ogawa, K.; Watanabe, T.; Tsurugi, J.; Ono, S. *Carbohydr. Res.* **1972**, *23*, 399–405.
- Fariña, J. I.; Siñeriz, F.; Molina, O. E.; Perotti, N. I. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *44*, 41–50.